

ZUR STRUKTUR DER FETTSÄURESYNTHETASE AUS HEFE

**Untersuchungen mit spezifischem
Anti-Fettsäuresynthetase Serum**

Partielle Proteolyse des Multienzymkomplexes

Stefan Hess

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ZUR STRUKTUR DER FETTSÄURESYNTHETASE AUS HEFE

Untersuchungen mit spezifischem Anti-Fettsäure-
synthetase Serum

Partielle Proteolyse des Multienzymkomplexes.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereichs Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilian-Universität

München

vorgelegt von

Stefan Hess

München 1976

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lynen
2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Oktober 1976



Die vorliegende Arbeit wurde vom Juni 1971 bis März 1976 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. Feodor Lynen am Biochemischen Institut der Universität München und am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, ausgeführt.

Herrn Professor Dr. Feodor Lynen danke ich herzlich für das Interesse, welches er mir und meiner Arbeit jederzeit zuteilwerden ließ.

Für ihre zuverlässige und geschickte Mitarbeit in der Zeit vom April 1973 bis Oktober 1974 danke ich Frau G. Dannhauer. Fräulein C. Verfürth danke ich für ihre ausgezeichnete Unterstützung seit November 1974.

Verwendete Abkürzungen

FSS	Fettsäuresynthetase
CoA, CoA-SH	Coenzym A
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid, reduziert
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, reduziert
FMN	Flavinmononucleotid
Anti-FSS	durch Fällern mit 40 % der Sättigung Ammonium- sulfat gewonnene Antikörperfraktion aus spezifischem Anti-Fettsäuresynthetase-Serum
Anti-FSS(γ G)	wie oben, jedoch zusätzlich über DEAE- Cellulose gereinigt
ACP	Acyl carrier protein
E, mE	Einheit, Millieinheit
E	Extinktion
ΔE	Extinktionsänderung
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
PPO	2,5-Diphenyloxazol
POPOP	1,4-Bis-2-(5-phenyloxazol)-benzol
KFA	komplettes Freund'sches Adjuvans
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-

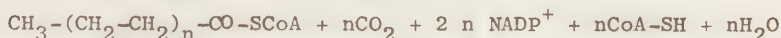
Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Immunologische Untersuchungen an der Fettsäuresynthetase	5
1. Einfluß von Anti-Fettsäuresynthetase-Serum auf die Gesamtaktivität	6
2. Einfluß von Anti-Fettsäuresynthetase-Serum auf die Teilaktivitäten	8
3. Über den Mechanismus der Hemmung	19
4. Untersuchungen an gespaltener Fettsäuresynthetase	21
III. Partielle Hydrolyse von Fettsäuresynthetase	25
1. Versuche zur Spaltung mit Trypsin	26
2. Versuche zur Spaltung mit Papain	26
IV. Diskussion	41
V. Experimentelle Einzelheiten	45
1. Verwendete Geräte	45
2. Käufliche Chemikalien, Substrate und Enzyme	46
3. Synthese von Substraten	47
4. Allgemeine analytische Methoden	47
a) Proteinbestimmung	47
b) Radioaktivitätsbestimmungen	48
c) Gehaltsbestimmung von Thioestern	48

5. Isolierung und Aktivitätsbestimmung von Fettsäuresynthetase	48
6. Zu Kapitel II	50
a) Gewinnung der Anti-Fettsäuresynthetase-Seren	50
b) Doppeldiffusion nach Ouchterlony	51
c) Immuno-Elektrophorese	52
d) Anreicherung der γ -Globuline	52
e) Gesamtaktivität der Fettsäuresynthetase in Gegenwart von Anti-FSS	53
f) Kondensierende Teilaktivität in Gegenwart von Anti-FSS	53
g) β -Ketoacylreduktase in Gegenwart von Anti-FSS	53
h) Enoylreduktase (Diaphorase-Aktivität) in Gegenwart von Anti-FSS	54
i) Triacetsäurelacton (TAL)-Bildung in Gegenwart von Anti-FSS	54
j) Acetyl-Transferase in Gegenwart von Anti-FSS	55
k) Malonyl-Transferase in Gegenwart von Anti-FSS	55
l) Palmityl-Transferase in Gegenwart von Anti-FSS	56
m) Verteilung der Endprodukte nach Inkubation mit Anti-FSS	56
n) Zum Mechanismus der Hemmung durch Anti-FSS	57
o) Disk-Immunoelktrophorese	57
7. Zu Kapitel III	57
a) Kinetik der limitierten Hydrolyse mit Trypsin	57
b) Kinetik der limitierten Hydrolyse mit Papain	58
c) Rohrzuckergradientenzentrifugation von papaingespaltener Fettsäuresynthetase	58
d) Analytische Ultrazentrifugation	59
e) Beladung mit 1- 14 C-Jodacetamid	59
f) Gel-Filtration von papaingespaltener Fettsäuresynthetase	60
g) Präparative Anreicherung des Spaltstückes	60
h) Polyacrylamidgelelektrophorese in Gegenwart von Natrium-Dodecylsulfat	61
i) Gewinnung des Anti-Spaltstück-Serums	61
j) Immunopräzipitation mit Anti-Spaltstück-Serum	61

I. Einleitung

Die Biosynthese langkettiger Fettsäuren verläuft im allgemeinen gemäß der folgenden Bruttogleichung (1).



In vielen Organismen treten jedoch nicht die Acyl-CoA Verbindungen, sondern die freien Fettsäuren als Produkt auf. Während in Bakterien und Chloroplasten diese Synthese von einer Reihe individueller Enzyme katalysiert wird (2,3), findet man in Hefe und in tierischen Geweben stabile "Multienzymkomplexe" (1,4-8).

In dem von Lynen aus Hefe isolierten Multienzymkomplex, einem einheitlichen Protein vom Molekulargewicht 2.3 Millionen, konnten die 7 Teilschritte der Fettsäurebiosynthese mit Hilfe von Modellreaktionen einzeln nachgewiesen werden (1,9). Der in Abb. 1 dargestellte Syntheseverlauf sei im folgenden kurz erläutert:

In der Startreaktion wird ein Acetylrest von Acetyl-CoA über die sogenannte "zentrale" SH-Gruppe (S_ZH) auf die sogenannte "periphere" SH-Gruppe (S_pH) übertragen. In einer weiteren Reaktion wird ein Malonylrest von Malonyl-CoA auf die "zentrale" SH-Gruppe übertragen. Unter Abspaltung von CO_2 werden die beiden Reste zum Acetoacetylrest kondensiert.

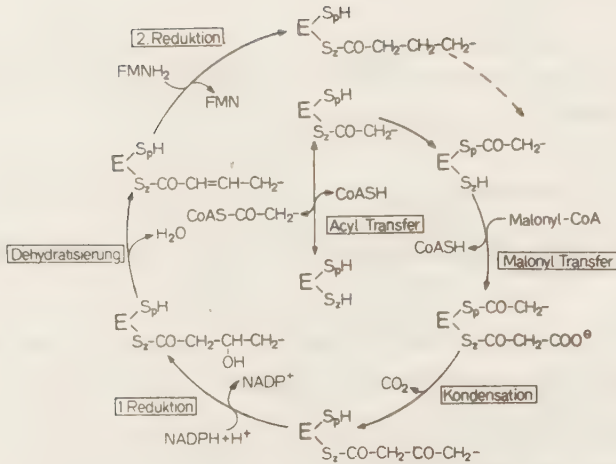


Abb. 1: Reaktionsschema der Fettsäuresynthese am Multienzymkomplex Fettsäuresynthetase aus Hefe

Dieser Rest bleibt bis zum nächsten Verlängerungsschritt kovalent an die "zentrale" SH-Gruppe gebunden, die Bestandteil eines über Serin an Protein gebundenen 4'-Phosphopantetheins ist. Die thioesterartig gebundenen Zwischenprodukte können, bedingt durch die Struktur des 4'-Phosphopantetheins, den aktiven Zentren der einzelnen Teilenzyme zugeführt werden. Dazu gehört die Reduktion des Acetoacetylrestes zum β -Hydroxybutyrylrest mit NADPH als Coenzym, die Dehydratisierung zum Crotonylrest und dessen Reduktion zum Butyrylrest mit NADPH und FMN als Coenzym. Dieser gesättigte Acylrest wird nun auf die "periphere" SH-Gruppe zurück-

übertragen und steht für den nächsten Verlängerungszyclus zur Verfügung. Nach 7-bis 8-maligem Durchlaufen des Reaktionszyclus wird die Synthese in Hefe durch die Übertragung des entstandenen Palmityl- bzw. Stearylrestes auf CoA beendet.

Die Mechanismen der einzelnen Teilreaktionen konnten durch Untersuchungen mit Substratmodellen (1), verschiedenen Hemmstoffen (1,10) und schließlich auch durch die Bestimmung von Primärstrukturen in einzelnen aktiven Zentren (11-14) weitgehend aufgeklärt werden. Dagegen fehlen bisher genauere Kenntnisse über den Aufbau des Multienzymkomplexes.

Sumper (15) gelang es, den Komplex vom Mol.Gew. 2.3 Mill. reversibel in kleinere Bruchstücke bis herab zu einem Molekulargewicht von etwa 200 000 zu spalten. Die präparative Isolierung einzelner Teilfunktionen aus dem Gemisch blieb aber bis heute erfolglos.

Aus genetischen Untersuchungen konnte Schweizer folgern, daß Hefe-Fettsäuresynthetase aus nur zwei verschiedenen multifunktionellen Polypeptidketten A und B besteht, welche von zwei voneinander unabhängigen Genloci fas 2 und fas 1 codiert werden (16). Mit Hilfe der SDS-Elektrophorese konnte er das Molekulargewicht der beiden Ketten zu 185 000 (A) und 179 000 (B) bestimmen.

Im Verlauf der Evolution scheint der Übergang von Einzelenzymen zu multifunktionellen Polypeptidketten allgemein begünstigt zu sein. So findet man beim Vergleich der Tryptophan-Synthetasen aus *E. coli* und Hefe einen derartigen Übergang (17,18). Auch die Acetyl-CoA-Carboxylasen der beiden Organismen unterscheiden sich in dieser Weise (19-21). Während bei der Tryptophan-Synthetase aus Hefe zwei Proteinketten miteinander verschmolzen sind, besteht die Acetyl-CoA-Carboxylase aus Hefe aus drei miteinander verschmolzenen Proteinketten.

Sehr wahrscheinlich sind solche multifunktionellen Polypeptidketten durch die Fusion nebeneinanderliegender Gene entstanden, ein Vorgang, der von Yourno und Kohno (22) am Beispiel zweier Enzyme der Histidin-Biosynthese in *S. typhimurium* experimentell nachvollzogen werden konnte.

Neben dem bekannten kinetischen Vorteil der Synthese an einem Multienzymkomplex gegenüber der Synthese durch Einzelenzyme bietet der Aufbau der Fettsäuresynthetase aus nur zwei multifunktionellen Polypeptidketten den zusätzlichen Vorteil, daß das Problem der stöchiometrischen Synthese von ursprünglich 7 Polypeptidketten auf 2 reduziert wird.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich im ersten Teil mit der Frage, ob mit immunologischen Methoden Einblicke in die Struktur des Komplexes erhalten werden können. Im zweiten Teil wird über Versuche berichtet, enzymatisch aktive Bruchstücke des Multienzymkomplexes nach kurzzeitiger Einwirkung proteolytischer Enzyme zu isolieren.

II. Immunologische Untersuchungen an der Fettsäure-synthetase

Die mir Hilfe der Elektronenmikroskopie (23) und der Röntgenkleinwinkel-Streuung (29) gewonnenen Daten ergaben für die Quartärstruktur des Fettsäuresynthetase-Komplexes das Bild eines hohlen Rotationsellipsoids, welcher in der Mitte der Längsachse von einer Trennwand geteilt wird.

Willecke bereitete Kaninchen-Anti-Fettsäuresynthetase-Serum (Anti-FSS), konnte jedoch nach Inkubation der Fettsäuresynthetase mit Anti-FSS keine Hemmung der enzymatischen Aktivität beobachten (25). Dieser Befund wurde als Bestätigung der Hohlraumstruktur gedeutet: die relativ kleinen Substrate können zu den aktiven Zentren im Hohlkörper gelangen, die wesentlich größeren Antikörper erreichen diese jedoch nicht.

Cinader (26) konnte zeigen, daß der Anteil von hemmenden Antikörpern in einem Anti-Enzym-Serum mit der Immunisierungsdauer zunimmt.

Nach einem veränderten Immunisierungsschema wurde daher erneut Anti-Fettsäuresynthetase Serum bereitet. Der Titer, der bei Willecke nur etwa 1:4 betrug, konnte auf 1:64 erhöht werden (s. Abb. 2). Die immunologische Homogenität des verwendeten Antigens ist in der Immuno-Elektrophorese (Abb. 3) zu erkennen.

Abb. 3

Abb. 2

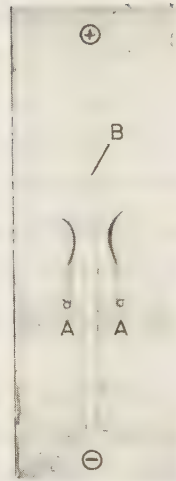
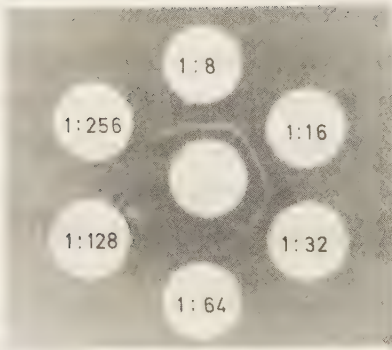


Abb. 2: Titerbestimmung des Anti-FSS-Serums durch Doppel-diffusion

Äußere Löcher: Anti-FSS-Serum verdünnt im jeweils angegebenen Verhältnis; inneres Loch: FSS (1 mg/ml)

Abb. 3: Immunelektrophorese von Fettsäuresynthetase mit Anti-FSS-Serum

A: Fettsäuresynthetase; Elektrophorese bei 4 mA, Dauer 1 Std.

B: Anti-FSS-Serum (1:4 verdünnt)

1. Einfluß von Anti-Fettsäuresynthetase-Serum auf die Gesamtaktivität

Für optische Bestimmungen von Enzymaktivitäten wurde das spezifische Kaninchen-Antiserum durch Chromatographie an DEAE-Cellulose von stark absorbierenden Stoffen befreit. Wurde nun Fettsäuresynthetase mit steigenden Mengen der

so erhaltenen γ -Globulin-Fraktion inkubiert, konnte eine Hemmung der Fettsäuresynthese bis zu 25 % Restaktivität erreicht werden (Abb. 4). Auch ein sehr großer Überschuß von Anti-Serum, sowie längere Inkubationszeiten, ergaben keine weitere Hemmung. Das Serum eines nicht behandelten Kaninchens zeigt diesen Effekt nicht.

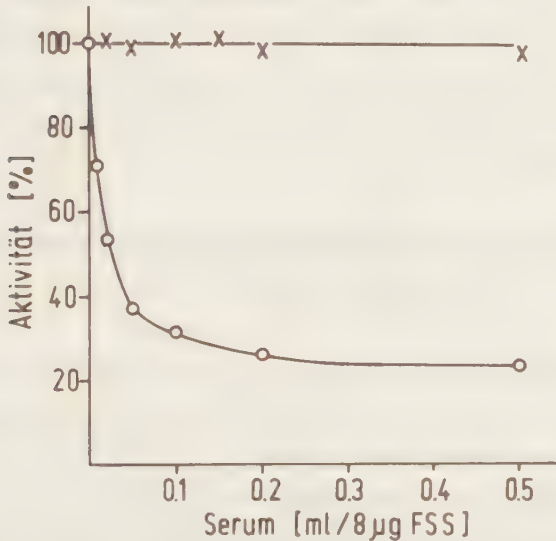


Abb. 4: Abhängigkeit der Fettsäuresynthetase-Aktivität von der Anti-FSS Konzentration

o : 8 μ g Fettsäuresynthetase (1400 mE/mg) wurden im Volumen 0,2 ml in der Küvette mit den angegebenen Mengen Anti-FSS-Serum 5 Min. bei 25° C vorinkubiert, anschließend Substratzugabe und Start der Reaktion.

x : wie oben, jedoch wurde statt mit Anti-FSS-Serum mit den angegebenen Mengen Serum eines nicht behandelten Kaninchens (Kontrollserum) vorinkubiert.

Wird der Inkubationsansatz nach Bestimmung der Fettsäuresynthetase-Aktivität 20 Min. bei 5 000 xg zentrifugiert und die im Überstand verbleibende Aktivität bestimmt, so ergibt sich ein anderes Bild (Abb. 5): Mit steigenden Mengen Anti-FSS läßt sich die gesamte enzymatische Aktivität präzipitieren (s. Kurve II, Abb. 5). Die Differenz der Kurven I und II zeigt, daß Fettsäuresynthetase auch nach der Reaktion mit Antikörpern noch einen Rest von 25 % ihrer ursprünglichen Aktivität behält. Qualitativ gleiche Ergebnisse werden auch mit spezifischen Anti-FSS-Seren von zwei weiteren Kaninchen erzielt.

Für derartige unvollständige Hemmung eines Enzyms durch sein spezifisches Antiserum gibt es in der Literatur eine Reihe von Beispielen (27). Ob es sich im Fall der Fettsäuresynthetase um die Konkurrenz von hemmenden und nicht hemmenden Antikörpern um ein und dieselbe Bindungsstelle an einem der aktiven Zentren oder in der Nähe desselben handelt, oder ob alle Antikörper an diesem Zentrum nur eine partielle Schädigung der Aktivität bewirken, konnte durch diese Ergebnisse nicht geklärt werden.

2. Einfluß von Anti-Fettsäuresynthetase-Serum auf die Teilaktivitäten

Durch weitere Versuche sollte geklärt werden, ob und wie weit einzelne Teilaktivitäten der Fettsäuresynthetase durch Inkubation mit Anti-FSS hemmbar sind. Möglicherweise konnte dadurch mehr Einsicht in die räumliche Anordnung der einzel-

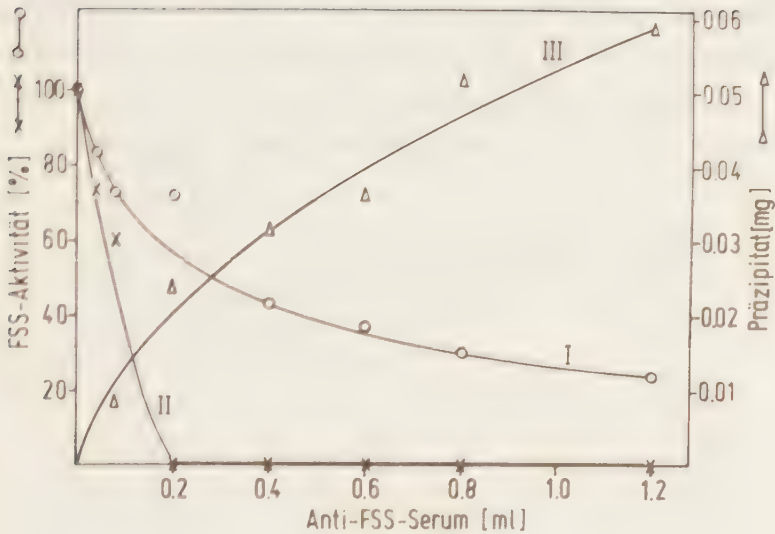


Abb. 5: Einfluß der Präzipitation auf die Fettsäuresynthetase-Aktivität

o : je 100 µg Fettsäuresynthetase (1200 mE/mg) wurden in 1 ml mit steigenden Mengen Anti-FSS-Serum 15 Min. bei 25° C, anschließend 1 Std. bei 0° C inkubiert. 1/10 des Inkubationsansatzes wurde zur Bestimmung der Fettsäuresynthetase-Aktivität eingesetzt.

x : der selbe Inkubationsansatz wurde 20 Min. bei 5000 xg zentrifugiert und 100 µl des Überstandes zur Bestimmung der Fettsäuresynthetase-Aktivität eingesetzt.

Δ : der Niederschlag wurde zur Proteinbestimmung eingesetzt.

nen aktiven Zentren im Multienzymkomplex erhalten werden. Zunächst wurden die kondensierende Teilaktivität, die β -Ketoacylreduktase und die Enoylreduktase untersucht. Wie aus den Abb. 6-8 ersichtlich, hat Anti-FSS keinen nennenswerten Einfluß auf diese Teilaktivitäten. Die Hemmung

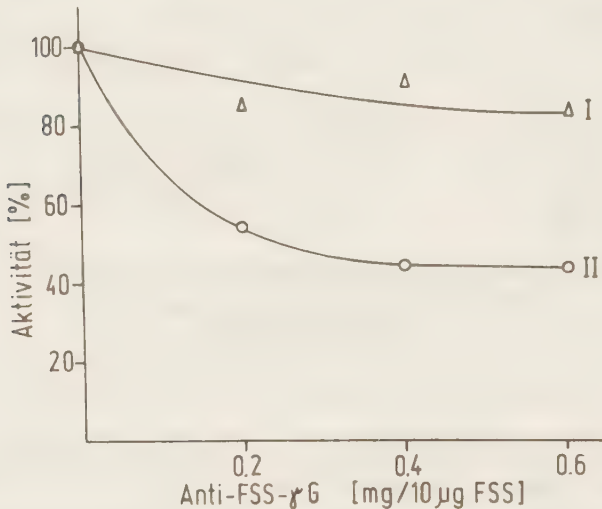


Abb. 6: Wirkung von Anti-FSS auf das kondensierende Enzym

Δ : Aktivität des kondensierenden Enzyms nach Inkubation von Fettsäuresynthetase mit Anti-FSS- γ G im angegebenen Verhältnis

$\circ$: Gesamtaktivität (s. Abb. 4)

der Gesamtreaktion sollte also auf andere Teilreaktionen zurückzuführen sein. Da die β -Hydroxyacyldehydratase mit dem Modells substrat nur sehr langsam abläuft und deshalb zur optischen Bestimmung bei 263 nm sehr große Enzymmengen eingesetzt werden müssen (0,5 - 2 mg Enzym), konnte diese

Teilaktivität nach Inkubation mit Anti-FSS wegen der hohen Absorption von Anti-FSS bei dieser Wellenlänge nicht bestimmt werden.

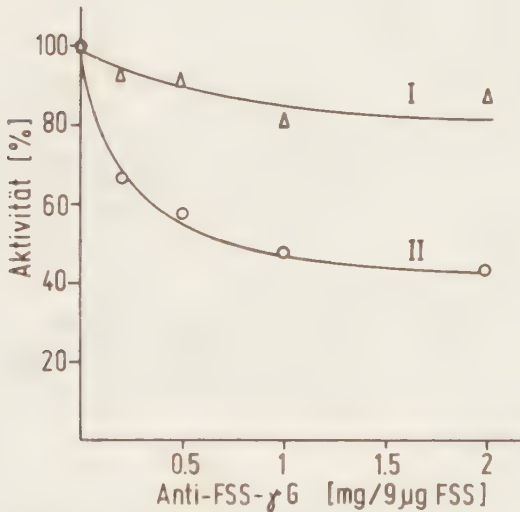


Abb. 7: Wirkung von Anti-FSS auf die β -Ketoacylreduktase

Δ : Aktivität der β -Ketoacylreduktase nach Inkubation von Fettsäuresynthetase mit Anti-FSS- γ_6 im angegebenen Verhältnis

o : Gesamtaktivität (s. Abb. 4)

Um Auskunft über das Verhalten weiterer Teilaktivitäten nach Inkubation mit Anti-FSS zu erhalten, wurde die Beobachtung ausgenutzt, daß Fettsäuresynthetase aus Acetyl-CoA und Malonyl-CoA in Abwesenheit von NADPH die Bildung des unphysiologischen Umwandlungsproduktes Triacetsäurelacton (TAL) katalysiert (28).

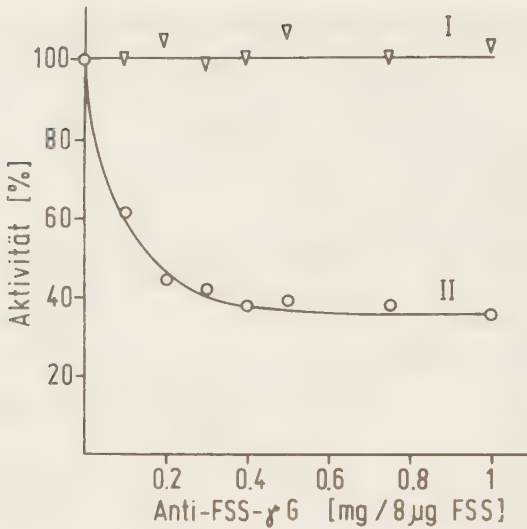


Abb. 8: Wirkung von Anti-FSS auf die Enoylreduktase

▽ : Aktivität der Enoylreduktase nach Inkubation von Fettsäuresynthetase mit Anti-FSS-γG im angegebenen Verhältnis, bestimmt mit Dichlorphenolindophenol als Substrat.

o : Gesamtaktivität (s. Abb. 4)

Zur Synthese von TAL nach dem von Lynen (28) vorgeschlagenen Mechanismus werden folgende Teilfunktionen benötigt:

Acetyl-Transfer, Malonyl-Transfer und Kondensation (s. Abb. 9).

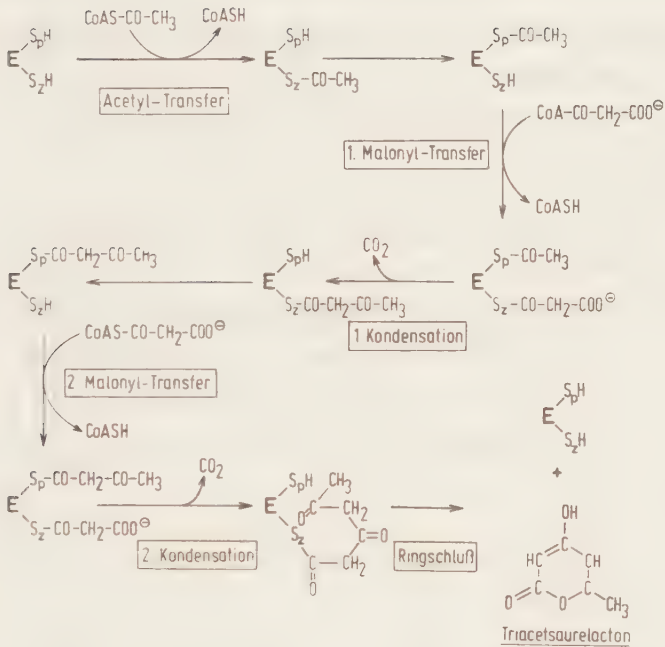


Abb. 9: Hypothetischer Verlauf der Triacetsäurelacton-Bildung

Bei der Bestimmung der kondensierenden Teilaktivität dagegen bestimmt man die unter Einbau von $^{14}\text{CO}_2$ erfolgende Spaltung von S-Acetoacetyl-N-acetylcysteamin, zu deren Ablauf neben der kondensierenden Funktion selbst auch eine intakte Acetyl-Transferase, nicht jedoch die Malonyl-Transferase benötigt werden, da der zum Malonylrest umgewandelte Acetoacetylrest bei der Spaltung an Cysteamin gebunden bleibt (25).

wortlich ist. Im folgenden wurden daher die einzelnen Transferreaktionen der Fettsäuresynthetase direkt auf ihre Hemmbarkeit durch Anti-FSS-Serum untersucht.

Aus Abb. 11,12 ist zu ersehen, daß - wie zu erwarten - nicht die Acetyl-Transferase, wohl aber die Malonyl-Transferase durch Anti-FSS-Serum gehemmt wird.

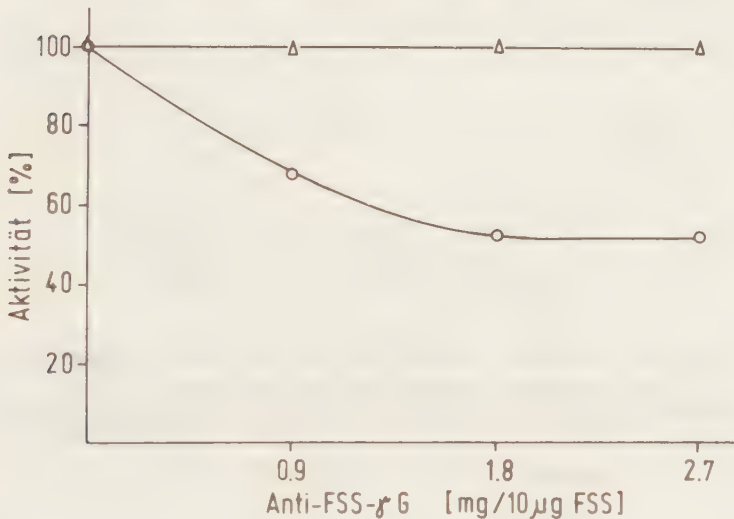


Abb. 11: Wirkung von Anti-FSS auf die Acetyltransferase

Δ : Aktivität der Acetyltransferase nach Inkubation von Fettsäuresynthetase mit Anti-FSS- γ G im angegebenen Verhältnis

o : Gesamtaktivität (s. Abb. 4)

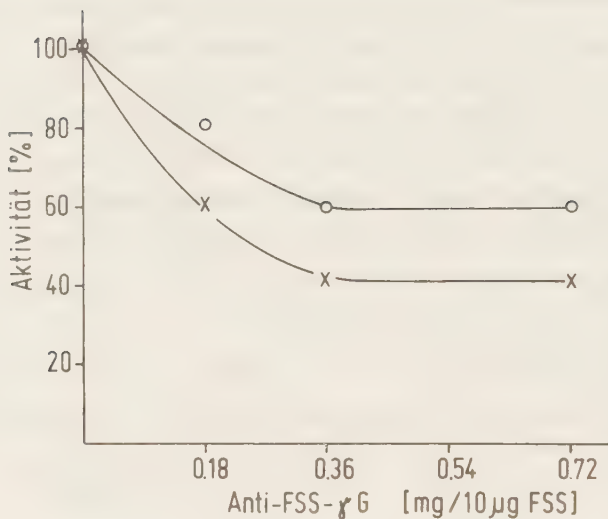


Abb. 12: Wirkung von Anti-FSS auf die Malonyltransferase

x : Aktivität der Malonyltransferase nach Inkubation von Fettsäuresynthetase mit Anti-FSS- γ G im angegebenen Verhältnis

o : Gesamtaktivität (s. Abb. 4)

Aus peptidchemischen Arbeiten von Schweizer (11) und Schreckenbach (14), aus genetischen Untersuchungen von Schweizer (29) und durch Beladungsversuche von Engeser (30) wurde deutlich, daß bei der Fettsäuresynthetase aus Hefe der Malonyl-Transfer sowie der die Reaktion beendende Palmityl-Transfer durch ein und dasselbe Teilenzym katalysiert werden. Wenn dies richtig ist, sollte auch der Palmityl-Transfer durch Anti-FSS-Serum hemmbar sein. Wie Abb. 13

zeigt, ist dies auch der Fall.

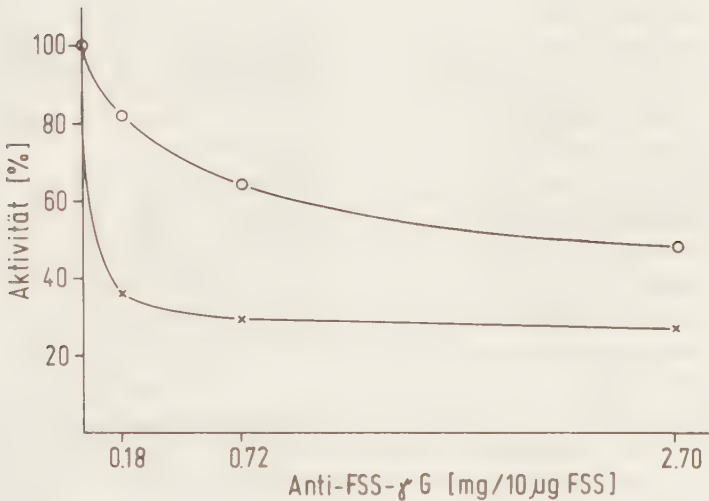


Abb. 13: Wirkung von Anti-FSS auf die Palmityltransferase
x : Aktivität der Palmityltransferase nach Inkubation
von Fettsäuresynthetase mit Anti-FSS- γ G im angegebenen Ver-
hältnis
o : Gesamtaktivität (s. Abb. 4)

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der letzten Versuche
noch einmal zusammengefaßt.

Durch die Hemmung der Malonyl- und Palmityltransferase
könnte eine Veränderung der Endproduktverteilung bei der
Fettsäuresynthese auftreten. Wie Sumper zeigen konnte
(31), bewirkt eine Verringerung des Malonyl-CoA Angebotes
eine Verschiebung zu Gunsten der Synthese von kürzeren
Fettsäuren. Eine partielle Hemmung der Malonyltransferase
sollte den gleichen Effekt haben. Die Hemmung der Palmityl-

Tab. 1: Einfluß von Anti-FSS auf einzelne Teilreaktionen der Fettsäuresynthetase

Reaktion	Restaktivität* nach Behandlung mit Anti-FSS (%)
Gesamtreaktion	50
Acetyl-Transfer	100
Malonyl-Transfer	33**
Kondensation	90
β -Ketoacylreduktion	87
Dehydratisierung	nicht bestimmt
2,3-Enoylreduktion	100
Palmityltransfer	27
TAL-Bildung	50

* Die angegebene Restaktivität wurde jeweils auf den Wert bezogen, bei dem die Gesamtaktivität um 50 % gehemmt wurde.

** Dieser Wert stammt nicht aus dem auf S. 16 geschilderten Experiment, sondern wurde unabhängig davon bestimmt.

transferase dagegen könnte das Produktverhältnis zu längeren Ketten hin verschieben. Ein bisher nur vorläufiges Ergebnis zeigt Abb. 14, in welcher die prozentuale Verteilung der radiogaschromatographisch aufgetrennten Produkte eines normalen Fettsäuresyntheseansatzes mit einem durch Anti-FSS gehemmten verglichen wird.

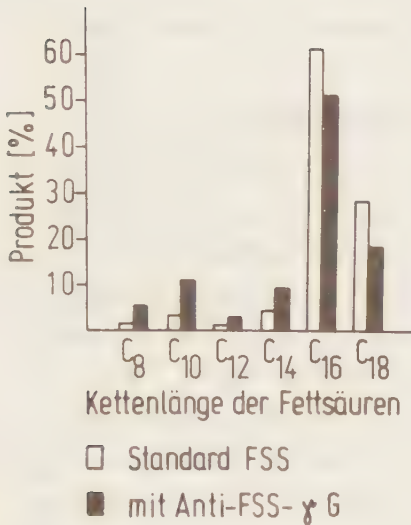


Abb. 14: Einfluß von Anti-FSS auf die Endproduktverteilung bei der Fettsäuresynthese

weiße Balken: Standard-Ansatz der Fettsäuresynthese

schwarze Balken: Standard-Ansatz, jedoch Vorinkubation der Fettsäuresynthetase mit 1 ml Anti-FSS-Serum/100 µg Enzym

Wie zu erkennen, ist das Verhältnis C_{16}/C_{18} gar nicht, das Verhältnis $C_8-C_{14}/C_{16}-C_{18}$ durch Anti-FSS zu Gunsten der kürzeren Fettsäuren verschoben. Ob diese Verschiebung signifikant ist, müßte durch weitere Versuche geklärt werden.

3. Über den Mechanismus der Hemmung

Wie schon weiter oben angedeutet, sind prinzipiell drei verschiedene Wege denkbar, nach denen spezifische Antikörper Enzymaktivitäten hemmen (32):

- a) Die Antikörper können direkt mit dem aktiven Zentrum des Enzyms reagieren.

- b) Die Antikörper greifen in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums an und verhindern rein sterisch den Zutritt der Substrate.
- c) Die Antikörper reagieren an anderen Regionen des Enzyms, wodurch eine Konformationsänderung im aktiven Zentrum erreicht wird, die eine Bindung des Substrates verhindert, oder das Enzym kann, bedingt durch die Bindung des Antikörpers, eine für die Reaktion notwendige Konformationsänderung nicht ausführen.

Bei anderen Enzymen konnte die Hemmung durch Antikörper teilweise aufgehoben werden, indem man das Enzym vor Zugabe der Antikörper mit Substrat inkubierte (33,34). Wie aus Tab. 2 ersichtlich, konnte auch bei der Fettsäuresynthetase die Antikörperwirkung teilweise verhindert werden. Bei diesem Versuch wurde das Enzym mit Acetyl-CoA und Malonyl-CoA vorinkubiert, dann wurde Anti-FSS zugegeben und erst jetzt mit NADPH gestartet.

Tab. 2: Schutzwirkung von Substraten bei der Hemmung durch Anti-FSS

	ohne Anti-FSS	1. Anti-FSS	1. Mal-CoA
		2. Malonyl-CoA +Acetyl-CoA	+Ac-CoA 2. Anti-FSS
Restaktivität (%)	100 ^{a)}	62 ^{b)}	79 ^{c)}

- a) Fettsäuresynthetase Standard-Test mit 10 µg Enzym, jedoch mit 0,1 µMol NADPH, anstatt Malonyl-CoA gestartet.
- b) wie oben, jedoch zusätzlich das Enzym vor Zugabe der Substrate bei 25° C 5 Min. mit 0,1 mg Anti-FSS-γG inkubiert
- c) wie b), jedoch Inkubation mit Anti-FSS-γG erst nach 2-minütiger Vorinkubation mit Acetyl- und Malonyl-CoA.

Bedeutet diese Schutzwirkung der Substrate, daß die Antikörper direkt mit einem der aktiven Zentren in Wechselwirkung treten? Für den Fall der Malonyl-Übertragung wurde dieser Frage nachgegangen. Es wurde die Abhängigkeit der Fettsäuresynthese Geschwindigkeit von der Malonyl-CoA Konzentration in Gegenwart verschiedener Anti-FSS-Konzentrationen bestimmt (s. Abb. 15a). Bei der Auftragung nach Lineweaver u. Burk (s. Abb. 15b) erkennt man, daß die Hemmung durch Anti-FSS nicht kompetitiv bezüglich Malonyl-CoA ist. Das aber spricht für einen unterschiedlichen Bindungsort von Malonylrest und Antikörper. Damit scheidet die Möglichkeit a) für den Mechanismus der Hemmung aus. Antwort auf die Frage nach der Hohlraumstruktur erhält man jedoch nicht: Die Antikörper könnten z.B. an der Oberfläche des Enzyms binden und damit den Zutritt von Malonyl-CoA an das aktive Zentrum der Malonyl-Transferase (im Inneren des Hohlkörpers) sterisch hindern.

4. Untersuchungen an gespaltener Fettsäuresynthetase

Wie Sumper (15) zeigen konnte, läßt sich der Multienzymkomplex Fettsäuresynthetase durch mehrmaliges Einfrieren in 1 M LiCl reversibel in Untereinheiten zerlegen. Die durch Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen Spaltstücke besaßen jeweils noch alle zur Reassoziaton des nativen Komplexes notwendigen Proteinkomponenten. Die bisher beste analytische Methode zur Auftrennung dieser Spaltstücke ist die Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Falls es

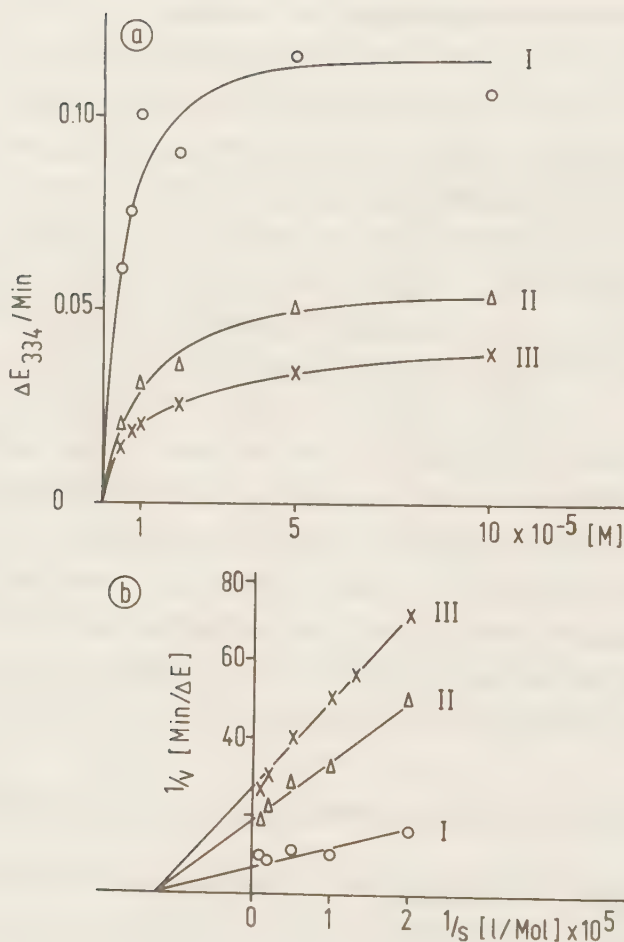


Abb. 15: Hemmung der Gesamtaktivität durch Anti-FSS

a) Malonyl-CoA Abhängigkeit der Fettsäuresynthese in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Anti-FSS- γ G

o : ohne Anti-FSS- γ G

Δ : 0,45 mg Anti-FSS- γ G/10 μ g Fettsäuresynthetase

x : 1,08 mg Anti-FSS- γ G/10 μ g Fettsäuresynthetase

b) Darstellung nach Lineweaver und Burk

sich bei den so erhaltenen Spaltstücken nur um mehr oder weniger große Assoziate identischer Untereinheiten handelt, sollten sie alle die gleiche Anzahl antigener Determinanten aufweisen. Um diese Frage zu prüfen, wurde ein Gel nach der elektrophoretischen Auftrennung eines LiCl-Spaltansatzes der Länge nach geteilt. Eine Hälfte wurde auf Protein angefärbt, während die andere in Agarose eingebettet und der Doppeldiffusion mit dem spezifischen Anti-FSS-Serum unterworfen wurde. Im rechten Teil von Abb. 16 ist zu erkennen, daß die Präzipitationslinie zwischen dem Acrylamidgel und dem Anti-FSS-Graben keine Spornbildung zeigt. Diese Spornbildung sollte aber auftreten, sobald bei den kleineren, schneller wandernden, also weiter unten im Gel liegenden Proteinkomponenten, antigene Determinanten verloren gegangen sind.

Es kann allerdings mit dieser Methode nicht ausgeschlossen werden, daß im unteren Teil des Gels unterschiedliche Komponenten sehr dicht nebeneinander auftreten und so ein Vorhandensein aller antigenen Determinanten auf einer Proteinkomponente vortäuschen.

Nach neueren Ergebnissen von Schweizer (16) besteht das Enzym aus nur zwei verschiedenen Polypeptidketten vom Molekulargewicht 185 000 und 179 000. Bei der Spaltung mit LiCl erhält man als kleinste Komponenten Proteine vom ungefähren Molekulargewicht 200 000. Offensichtlich werden aber die einzelnen unterschiedlichen Ketten in der Disk-

Elektrophorese nicht weit genug voneinander getrennt,
um eine Spornbildung erkennen zu lassen.

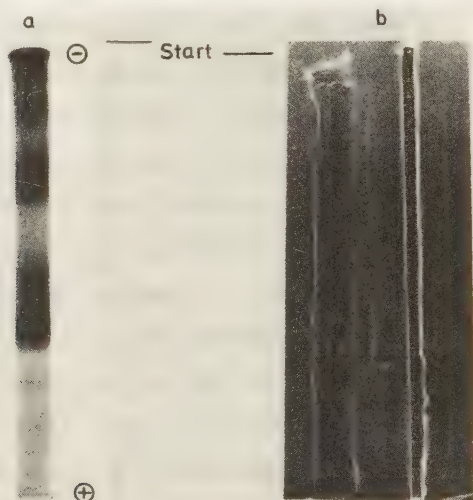


Abb. 16: Disk-Immunelektrophorese von LiCl-gespaltener
Fettsäuresynthetase

2,5 mg Fettsäuresynthetase wurden in 0,25 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 mit 0,25 mMol LiCl versetzt und 3 mal in einem Aceton-Trockeneis-Kältebad eingefroren und wieder aufgetaut. Der Ansatz wurde über Sephadex G 25 entsalzt und 20 µg Protein wurden auf einem Disk-Röhrchen (System Maurer 1) 5 Std. bei 4 mA pro Röhrchen der Elektrophorese unterworfen. Das Gel wurde in der Längsachse halbiert.

- a) mit Coomassie angefärbte Hälfte des Gels
- b) die andere Hälfte des Gels wurde mit einer 2 mm hohen Schicht 0,6 %iger Agarose (0,1 M Tris/HCl pH 7,5) umgossen.
In den Graben rechts neben dem Disk-Gel wurde Anti-FSS Serum gegeben. Diffusion etwa 48 Stdn.

III. Partielle Hydrolyse von Fettsäuresynthetase

In der Natur kommen eine Reihe von Enzymen vor, die zwar nur aus einer einzigen Polypeptidkette bestehen, jedoch mehrere biochemische Reaktionen katalysieren können (35,36).

Man nimmt heute an, daß sie durch die Fusion benachbarter Gene entstanden sind (37). Eine derartige Fusion zweier - für verschiedene Enzyme codierender - Gene konnte im Experiment nachvollzogen werden (22). Durch kurzzeitige Einwirkung proteolytischer Enzyme auf so entstandene multifunktionelle Polypeptidketten konnte die Fusion rückgängig gemacht werden und man erhielt wieder die aktiven Einzelenzyme (38). Man stellt sich vor, daß in derartigen Proteinen die ursprünglichen Einzelenzyme ihre globuläre Struktur im wesentlichen behalten haben und nur durch kurze Teile der Polypeptidkette verknüpft sind. Der Angriff proteolytischer Enzyme kann nun bevorzugt an diesen exponierten Verbindungsgliedern einsetzen (38,39) (s. Abb. 17).

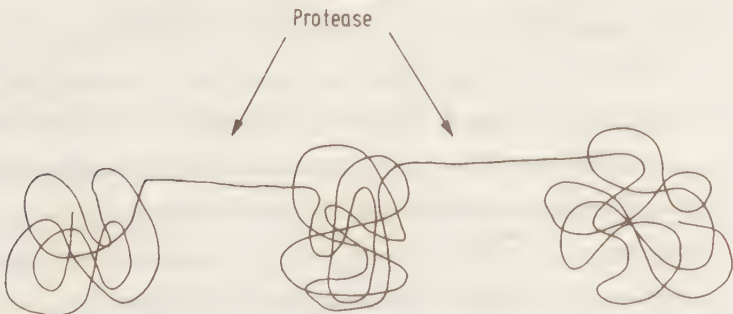


Abb. 17: Modell eines hypothetischen proteolytischen Angriffs auf eine multifunktionelle Polypeptidkette

Im folgenden Teil der Arbeit wird untersucht, ob sich diese Vorstellungen auf die aus nur zwei verschiedenen multifunktionellen Polypeptidketten aufgebaute Fettsäuresynthetase aus Hefe übertragen lassen.

1. Versuche zur Spaltung mit Trypsin

Um zu erkennen, ob einzelne enzymatisch aktive Teilenzyme durch partielle Hydrolyse mit Trypsin freigesetzt werden, wurden während der Spaltung mit Trypsin zu verschiedenen Zeiten einzelne Teilaktivitäten bestimmt. Wie aus Abb. 18 ersichtlich, werden die untersuchten Teilaktivitäten alle in vergleichbarer Zeit geschädigt.

Da offensichtlich schon sehr früh Peptidbindungen gespalten werden, welche für die einzelnen Teilfunktionen von essentieller Bedeutung sind, erschien es nicht sinnvoll, einzelne Teilenzyme aus dem Trypsin-Spaltansatz anzureichern.

2. Versuche zur Spaltung mit Papain

Im Gegensatz zu Trypsin, welches Peptidbindungen sehr spezifisch nur am Carboxylende von Lysin und Arginin spaltet, verhält sich Papain sehr unspezifisch und spaltet wahrscheinlich alle Peptidbindungen, allerdings mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Bevorzugt wird durch Papain die Peptidbindung nach der zweiten auf Phenylalanin zum Carboxylende hin folgenden Aminosäure gespalten (40).

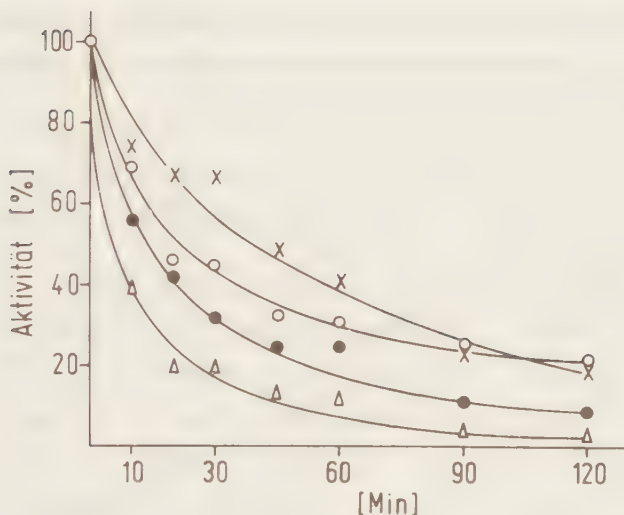


Abb. 18: Kinetik der Inaktivierung einzelner Fettsäuresynthetase-Aktivitäten durch Trypsin

4 mg Fettsäuresynthetase in 0,25 ml 0,1 M Tris/NaCl pH 7,5 (10 mM CaCl_2) wurden zum Zeitpunkt 0 mit 0,1 mg Trypsin bei 25° C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Aliquote mit 75 µg Trypsininhibitor/10 µg Trypsin versetzt und mit eiskaltem Puffer 16-fach verdünnt. Mit Aliquoten dieser Verdünnung wurden sofort die einzelnen Teilaktivitäten bestimmt.

●	: Gesamtaktivität	○	: Malonyltransferase
Δ	: β-Ketoacylreduktase	x	: Acetyltransferase

Verfolgt man nun die Aktivität der einzelnen Teilenzyme der Fettsäuresynthetase über die Zeit der Papainwirkung, so erkennt man (s. Abb. 19) ein sehr unterschiedliches Verhalten der einzelnen Aktivitäten. Während die kondensierende Aktivität und die β-Ketoacylreduktase gemeinsam mit der Gesamtreaktion sehr schnell abnehmen, bleiben Acetyl-

transferase, Malonyltransferase und Enoylreduktase wesentlich länger aktiv. Für das Verhalten der Acetyltransferase, welches in weiteren Experimenten reproduziert werden konnte, fehlt bislang eine plausible Erklärung.

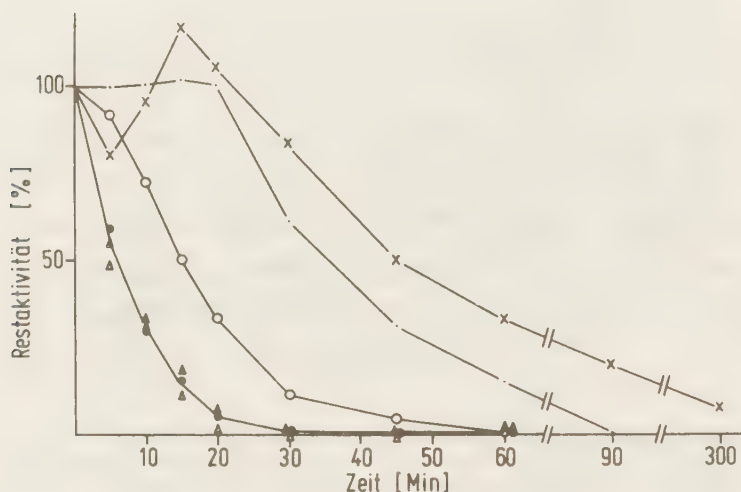


Abb. 19: Kinetik der Inaktivierung einzelner Fettsäuresynthetase-Aktivitäten durch Papain

5,5 mg Fettsäuresynthetase in 0,25 ml K-Phosphat pH 6,5 wurden zum Zeitpunkt 0 mit 0,1 mg Papain bei 25° C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Aliquote entnommen und mit eiskaltem Puffer 20-fach verdünnt. Aus dieser Verdünnung wurden sofort die einzelnen Teilaktivitäten bestimmt.

- | | | | |
|---|---------------------|---|-----------------------|
| Δ | : Gesamtaktivität | o | : Malonyltransferase |
| x | : Acetyltransferase | ▲ | : Kondensation |
| • | : Enoylreduktase* | ● | : β-Ketoacylreduktase |

* Aktivität wurde in einem Parallelexperiment bestimmt.

Hagen (41), der Fettsäuresynthetase ebenfalls mit Papain behandelte, stellte bereits fest, daß die Malonyltransferase gegenüber dieser Protease wesentlich stabiler ist, als die

Gesamtaktivität. Es gelang ihm mit Methoden der analytischen und präparativen Ultrazentrifugation jedoch nicht, kleinere enzymatisch aktive Bruchstücke nachzuweisen.

Im folgenden wird über Versuche berichtet, welche zur präparativen Isolierung eines noch in Teilaktivitäten intakten Bruchstückes führten.

Jodacetamid reagiert in sehr geringen Konzentrationen irreversibel mit Sulfhydryl-Gruppen. So kann mit Jodacetamid die Aktivität von Papain, welches eine Sulfhydryl-Gruppe im aktiven Zentrum trägt, gehemmt werden. Gleichzeitig wird jedoch auch die Fettsäuresynthetase geschädigt. Wie Oesterhelt (10) zeigen konnte, wird spezifisch die sog. periphere SH-Gruppe im aktiven Zentrum des kondensierenden Enzyms blockiert. Die restlichen Teilenzyme bleiben jedoch unbeeinflusst (42).

Unterbricht man nun eine Papain-Spaltung der Fettsäuresynthetase frühzeitig durch Zugabe von Jodacetamid und trennt das Gemisch über einen Rohrzuckerdichtegradienten, so ergibt sich nach der Fraktionierung das in Abb. 20 gezeigte Bild. Unbehandelte Fettsäuresynthetase ist nach der Zentrifugation bereits vollständig sedimentiert (Fraktion 1).

Nach der Spaltung mit Papain erscheint in Fraktion 8 ein zusätzlicher flavinhaltiger Proteingipfel, der gemeinsam mit Aldolase (Molekulargewicht 158 000) sedimentiert.

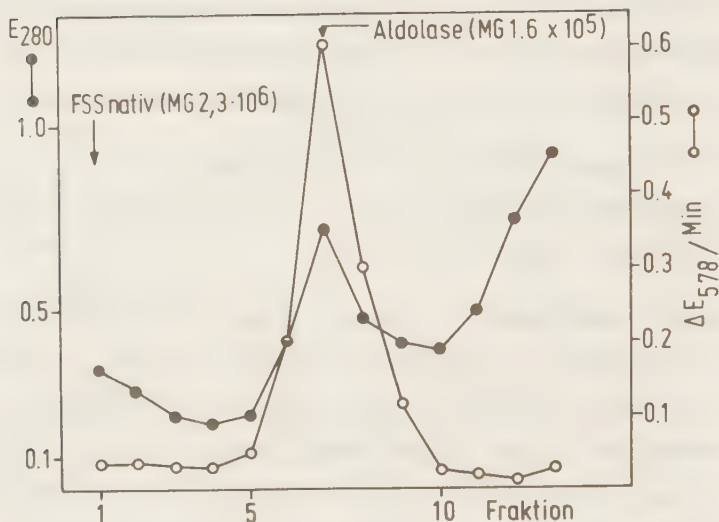


Abb. 20: Rohruckergradientenzentrifugation nach limitierter Papain-Hydrolyse

5 mg Fettsäuresynthetase in 0,2 ml 0,1 M K-Phosphat pH 6,5 wurden 15 Min. bei 25° C mit 0,6 mg Papain inkubiert. Nach Zugabe von Jodacetamid bis 10⁻² M wurde der Inkubationsansatz auf einen 8-25 %igen Saccharose-Gradienten in 0,1 M K-Phosphat pH 6,5 aufgesetzt. Rotor SW 40 Ti, Laufzeit 23 Stdn. bei 39 000 U/Min., 4° C. Die Becher wurden von unten fraktioniert.

- : Extinktion bei 280 nm
- : Aktivität der Enoylreduktase (Diaphorase Aktivität)

Unbehandelte Fettsäuresynthetase und Aldolase liefen als externer Standard auf gleichen Gradienten mit.

Auch in der analytischen Ultrazentrifuge (Abb. 21) erkennt man zwei Proteinkomponenten von denen die eine (I) wie unbehandelte Fettsäuresynthetase mit $s_{20,w} = 40,6 \pm 1,5$ S,

die andere (II) dagegen mit $s_{20,w} = 8,4 \pm 0,5$ S sedimentiert. Auch aus diesem Wert läßt sich ein Molekulargewicht von 160 000 abschätzen.

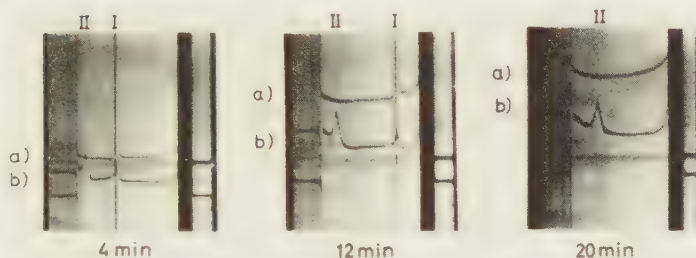


Abb. 21: Sedimentationsverhalten in der analytischen Ultrazentrifuge nach limitierter Papain-Hydrolyse

- a) Fettsäuresynthetase (5 mg/ml 0,1 M K-Phosphat pH 6,5)
- b) Fettsäuresynthetase (20 mg/ml 0,1 M K-Phosphat pH 6,5)
14 Min. bei 25°C mit 0,5 mg/ml Papain inkubiert und mit Jodacetamid (10^{-2} M) abgestoppt

Die Aufnahmen wurden zu den angegebenen Zeiten nach Erreichen der Höchstgeschwindigkeit gemacht (59 780 U/Min.). Temp. 10°C.

I. $s_{20,w} = 40,6 \pm 1,5$ S II. $s_{20,w} = 8,4 \pm 0,5$ S

Um größere Mengen der Proteinkomponente II zu erhalten, wurde der Papainspaltansatz nach Abstoppen mit Jodacetamid an Sepharose 6 B chromatographiert. Das Ergebnis derartiger Versuche ist in Abb. 22 gezeigt. Wieder erkennt man die Auftrennung in Komponente I und II, der zusätzliche Gipfel III entspricht niedermolekularen Komponenten. Die in Gipfel II auftretenden Teilaktivitäten Malonyltrans-

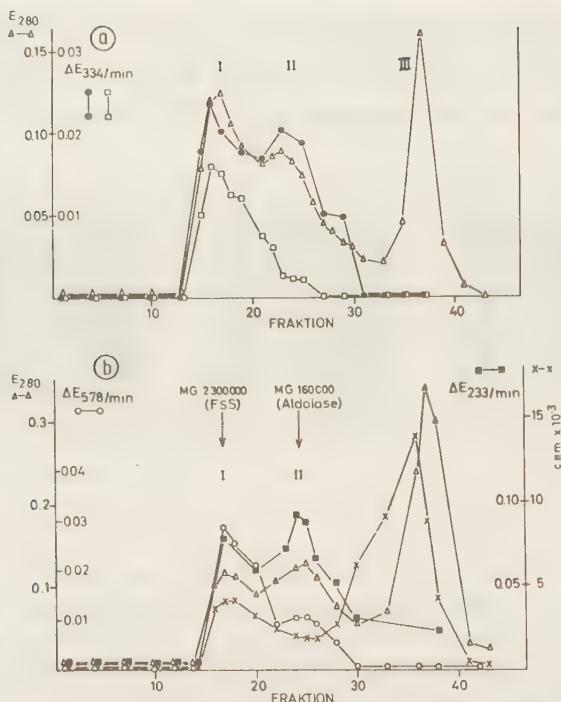


Abb. 22: Sepharose 6B Chromatographie nach limitierter Papain-Hydrolyse

a) 10 mg Fettsäuresynthetase in 0,7 ml 0,1 M K-Phosphat wurden mit 0,35 mg Papain bei 25° C inkubiert. Beendigung der Hydrolyse nach 12 Min. durch Zugabe von Jodacetamid bis 10^{-2} M. Der gesamte Inkubationsansatz wurde an Sepharose 6B (Säule 43 x 1,7 cm) chromatographiert.

△—△ : Extinktion bei 280 nm □—□ : β-Ketoacylreduktase
●—● : Acetyltransferase

b) 20 mg Fettsäuresynthetase wurden 2 Stdn. bei 0° C mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Jodacetamid (10^{-3} M, 60 uCi/uMol) inkubiert. Nach Abtrennen von nicht gebundenem Jodacetamid über Sephadex G 25 wurde das Enzym bei 100 000 xg konzentriert. 10 mg des so behandelten Enzyms wurden wie unter a) beschrieben mit Papain gespalten und an Sepharose 6B chromatographiert.

△—△ : Extinktion bei 280 nm ■—■ : Malonyltransferase
○—○ : Enoylreduktase (Diaphorase) x—x : Radioaktivität

ferase und Enoylreduktase liegen nach genetischen Befunden von Schweizer (16) auf Kette B. Die Zuordnung der Acetyltransferase - welche in Gipfel II ebenfalls aktiv ist - zu einer der beiden Ketten war auf genetischem Wege nicht möglich. Die β -Ketoacylreduktase, nach Schweizer auf Kette A lokalisiert, läßt sich in Gipfel II kaum noch nachweisen.

Aus Untersuchungen von Weithmann (43) ist bekannt, daß Fettsäuresynthetase nach der Dissoziation durch Einfrieren mit LiCl neben der bisher noch keiner Kette zugeordneten Acetyltransferase-Aktivität nur solche Teilaktivitäten besitzt, welche nach Schweizer auf Kette B liegen. Die der Kette A zugeordneten Teilenzyme sind nach der Dissoziation inaktiviert.

Im vorliegenden Fall müßte man daher mit der Möglichkeit rechnen, daß im Gipfel II des Sepharose 6 B Eluats zwar die Ketten A und B gleichzeitig vorhanden sind, aber als Folge der Dissoziation des Komplexes nur die Aktivitäten der auf Kette B gelegenen Teilenzyme nachgewiesen werden.

Um diese Frage zu klären, wurde das aktive Zentrum des auf Kette A lokalisierten kondensierenden Enzyms spezifisch mit 1-¹⁴C-Jodacetamid markiert (10). Nach Entfernen von überschüssigem radioaktivem Jodacetamid wurde mit Papain gespalten und die Spaltung mit nicht markiertem Jodacetamid beendet. Nach Chromatographie des Spaltansatzes an Sepharose 6 B sieht man deutlich die Abnahme der spezifischen Radioaktivität in Gipfel II (55 147 dpm/mg Protein)

verglichen mit Gipfel I (197 833 dpm/mg Protein) in Abb. 22b.

In Tab. 3 wird eine weitere Methode zur Anreicherung des Spaltstückes geschildert.

Tab. 3: Anreicherung eines enzymatisch aktiven Spaltstückes der Fettsäuresynthetase nach limitierter Papainhydrolyse

Nr.	Reinigungsstufe	Protein (mg)	Malonyltransferase (E)	Malonyltransferase (mE/mg)	β -Ketoacylreduktase (E)	β -Ketoacylreduktase (mE/mg)
1	Fettsäuresynthetase, unbehandelt	63	136	2159	173	2750
2	Fettsäuresynthetase nach Papainhydrolyse	63	54	864	27	448
3	255 000 x g Überstand	50	40	791	0,7	13
4	Ammoniumsulfatfällg. (0-50% d. S.)	19	10	525	0,4	21
5	Chromatographie an Sepharose 6B	10	9	932	0	0

Tab. 4: Vergleich der Teilaktivitäten des Spaltstückes mit den Teilaktivitäten nach der Spaltung mit Lithiumchlorid

	Acetyltransferase (mE/mg) (%)	Malonyltransferase (mE/mg) (%)	β -Ketoacylreduktase (mE/mg) (%)	Enoylreduktase (mE/mg) (%)	Beladung mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -JAA (cpm/mg)
Fettsäuresynthetase, unbehandelt	1125 100	2139 100	2750 100	8980 100	138 869
Nr. 5 aus Tab. 3	2250 200	932 43	0 0	8080 90	4 000
Fettsäuresynthetase, LiCl-gespalten*	- 100	- 60	- 0	- 100	

* s. Weithmann (43)

Hier wurde die Tatsache ausgenutzt, daß der intakte Multi-enzymkomplex im Schwerfeld der präparativen Ultrazentrifuge rasch sedimentiert. Durch fraktionierte Ammonsulfatfällung des Überstandes erhält man leicht relativ große Mengen des Spaltstückes, welches sich bei der Gelfiltration wie ein einheitliches Protein vom Molekulargewicht 160 000 verhält.

In Tab. 4 sind einige Teilaktivitäten des Spaltstückes mit den Aktivitäten nach Dissoziation von Fettsäuresynthetase mit LiCl verglichen. Die bei der Anreicherung der einen Kette zu erwartende Steigerung der spezifischen Teilaktivitäten auf das Doppelte wird unter Umständen nur dadurch nicht immer erreicht, daß einige Teilaktivitäten allein durch den Dissoziationseffekt geschädigt wurden (z.B. Malonyltransferase nach LiCl-Spaltung: 60 % Restaktivität).

Markiert man die "periphere" SH-Gruppe von Fettsäuresynthetase spezifisch mit 1-¹⁴C-Jodacetamid (s. Abb. 22, S. 30), reichert nach der Spaltung mit Papain das entstehende Spaltstück - wie in Tab. 3 geschildert - an und chromatographiert das Produkt zusätzlich über Sepharose 6 B (Bedingungen s. Abb. 22, S. 30), so erhält man ein Protein, welches die auf Kette B lokalisierten Aktivitäten sowie die Acetyltransferase-Aktivität besitzt. Die spezifische Radioaktivität von ursprünglich 138 869 cpm/mg Protein (das entspricht einem Verhältnis von 2,7 Carboxamido-

methylresten pro Molekel Fettsäuresynthetase) nimmt während der Anreicherung auf 4000 cpm/mg Protein ab.

Abb. 23 zeigt das Ergebnis einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von Na-Dodecylsulfat. Das nicht vorbehandelte Enzym konnte dabei nicht in die von Schweizer (16) gefundenen Proteinbanden A und B aufgetrennt werden. Das Spaltstück zeigt noch eine deutliche Bande an der Stelle von A und B, sowie eine Reihe schneller wandernder Komponenten. Das Vorhandensein einer Protein-Bande am Ort der unbehandelten Kette zusammen mit dem Fehlen von Radioaktivität in der verwendeten Protein-Fraktion (unter 3 %) charakterisiert diesen Teil des Spaltstücks als Kette B der Fettsäuresynthetase.

Ob die Polypeptidketten, denen die schneller laufenden Banden zuzuschreiben sind, durch die Hydrolyse aus A, B oder aus beiden Ketten entstanden sind, konnte nicht entschieden werden.

Versuche, das Spaltstück über Ionenaustauscher weiter zu reinigen, verliefen bislang ergebnislos.

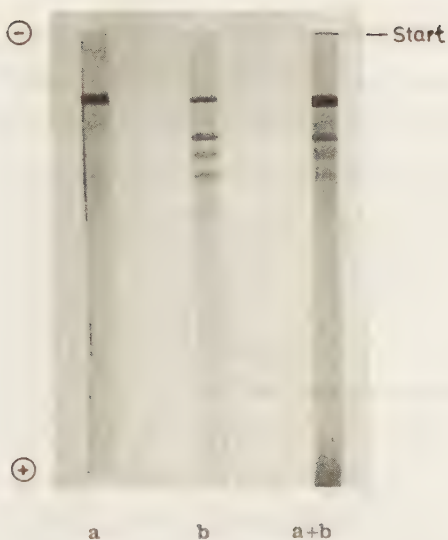


Abb. 23: Natrium-Dodecylsulfat-Gelelektrophorese des angereicherten Spaltstückes

a) Fettsäuresynthetase (10 μg)

b) Spaltstück (10 μg), angereichert nach Tab. 3, S. 32

Feldstärke: 2 V/cm, Laufzeit: 18 Stdn.

Da die partielle Hydrolyse der Fettsäuresynthetase mit Papain zu einer Anreicherung der Untereinheit B führte, wurden auch vorläufige Untersuchungen zur Isolierung der zweiten Untereinheit mit Hilfe immunologischer Methoden unternommen. Kaninchen-Antiserum gegen Kette B (Anti-B-Serum) sollte aus einem Ansatz von in Untereinheiten dissoziierter Fettsäuresynthetase nur die Untereinheit B präzipitieren. Als geeignete Dissoziationsmethode erschien das Einfrieren mit Lithiumchlorid, da diese Methode reversibel ist und folglich das Protein nur gering oder gar nicht schädigt (15). Leider erbrachten diese Versuche nicht den gewünschten Erfolg, zum Teil wohl deswegen, weil nach dieser Methode neben freiem A und B ein großer Teil des Proteins in Form höherer Aggregate $A_n B_m$ vorliegt.

Es wurde daher die von Hagen (41) beschriebene Dissoziation der Fettsäuresynthetase mit 1,7 %igem Natrium-Desoxycholat verwendet. Die Kette A läßt sich wieder durch Beladung mit radioaktivem Jodacetamid spezifisch markieren, während das Verhalten von Kette B über die Aktivität der Acetyltransferase verfolgt werden kann.

Während bei der Inkubation mit nicht dissoziiertem Enzym (s. Abb. 24 a) durch Anti-B-Serum der gesamte Multienzymkomplex präzipitiert wird, verhalten sich die beiden Ketten nach Dissoziation mit Desoxycholat unterschiedlich (s. Abb. 24b). Kette B (Acetyltransferase) wird vollstän-

dig präzipitiert, während 25 % der Kette A (Radioaktivität) im Überstand verbleiben.

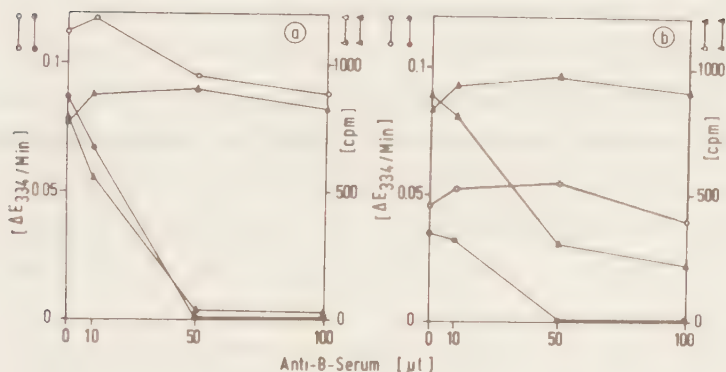


Abb. 24: Immunopräzipitation von dissoziierter Fettsäuresynthetase

- a) Fettsäuresynthetase wurde wie unter Abb. 22 beschrieben, mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Jodacetamid beladen. 100 μg dieses Enzyms wurden in 300 μl 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 mit steigenden Mengen Anti-B-Serum 15 Min. bei 25° C inkubiert,

○—○ : Aktivität der Acetyltransferase (50 μl)

△—△ : Radioaktivität (50 μl)

anschließend wurde 2 Min. bei 10000 x g zentrifugiert

●—● : Aktivität der Acetyltransferase (50 μl Überstand)

▲—▲ : Radioaktivität (50 μl Überstand)

- b) wie unter a), nur wurde das Enzym vor Zugabe des Antiserums 1 Std. bei 0° C in 1,7 %igem Natrium-Desoxycholat gehalten. (Bei der anschließenden Inkubation mit Anti-B-Serum war Natrium-Desoxycholat 20-fach verdünnt).

Ob die ungewünschte Copräzipitation von 75 % der Untereinheit A auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen Kette A im Anti-B-Serum oder auf Wechselwirkungen der Untereinheiten A und B untereinander zurückgehen, konnte bisher nicht geklärt werden.

Weitere Untersuchungen sollen zeigen, ob mit Hilfe dieser Methode eine präparative Isolierung und Charakterisierung der Untereinheit A möglich ist.

IV. Diskussion

Durch Inkubation von Fettsäuresynthetase aus Hefe mit spezifischem Anti-Fettsäuresynthetase-Serum (Titer 1:64) wird die Aktivität des Enzyms bis zu 25 % der Ausgangsaktivität gehemmt. Willecke konnte keine derartige Hemmung finden (25). Der Titer des von ihm bereiteten Antiserums war so niedrig (1:4), daß er zur Hemmung des Enzyms sehr große Mengen Antiserum hätte einsetzen müssen. Wegen der hohen Adsorption des Serums ist die Zugabe bei optischen Enzymbestimmungen jedoch stark limitiert.

Von den untersuchten Teilaktivitäten lassen sich nur die Malonyl- und Palmityltransferase hemmen. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Identität dieser beiden Teilenzyme (13, 14, 29).

Da sich die Hemmung durch das Antiserum nur unwesentlich durch Vorinkubation des Enzyms mit Substrat aufheben läßt und da die Hemmung nicht kompetitiv bezüglich Malonyl-CoA ist, kann das aktive Zentrum der Malonyl-Palmityltransferase selbst als Bindungsstelle für den Antikörper ausgeschlossen werden.

Der Grund für die volle Aktivität aller übrigen Teilenzyme nach Inkubation mit dem Antiserum kann darin liegen, daß die aktiven Zentren tatsächlich im Inneren eines Hohlkörpers angeordnet sind, der aus elektronenmikroskopischen

Bildern (23) und Daten der Röntgenkleinwinkelstreuung (24) hervorgeht. Die Anordnung der Malonyl- Palmityl-transferase an einer exponierten - also den Antikörpern zugänglichen Stelle - erscheint sinnvoll, da durch sie der Eintritt neuer Substrate in den Komplex, bzw. der Austritt des Produktes aus dem Komplex katalysiert wird.

Die Acetyltransferase, die man auch in der Peripherie des Komplexes erwartet, läßt sich durch die Antikörper nicht hemmen. Da auch Schweizer bei seinen genetischen Untersuchungen an über 700 Fettsäuresynthetase-Mutanten keine einzige mit einem Defekt in der Acetyltransferase beobachtete (29), besteht durchaus die Möglichkeit, daß der Acetylrest noch über einen weiteren - Acetyltransferase unabhängigen - Weg in den Syntheseprozess gelangt.

Um detailliertere Aussagen über die Struktur des Multienzymkomplexes machen zu können, bemühte man sich, nach Dissoziation des Komplexes einzelne Teilenzyme präparativ zu isolieren (41,25). Erst genetische Arbeiten Schweizers (16) zeigten, daß der Multienzymkomplex aus Hefe aus nur zwei verschiedenen, multifunktionellen Polypeptidketten aufgebaut ist. Aus den Molekulargewichten (16), dem FMN- und Pantethein-Gehalt (44,45) und aus Beladungsexperimenten (46) errechnet sich für den Komplex die Stöchiometrie (A_6B_6). Will man also einzelne Teilenzyme aus dem Komplex isolieren, so ist dies nur nach vorheriger Spaltung von

Peptidbindungen möglich. Mit diesem Ziel wurde die partielle Hydrolyse des Multienzymkomplexes durch proteolytische Enzyme untersucht.

Während bei der Behandlung von Fettsäuresynthetase mit Trypsin die Teilaktivitäten ohne Verzögerungsphase rasch geschädigt werden, ist ihr Verhalten nach Inkubation mit Papain sehr unterschiedlich. Offensichtlich werden durch Trypsin schnell essentielle Peptidbindungen gespalten, während Papain einige der aktiven "Domänen" über längere Zeit unbeeinflusst läßt.

Bei der Auftrennung eines Papain-Spaltansatzes über einen Rohrzuckerdichtegradienten zeigte sich, daß einige Teilaktivitäten neben dem ungespaltenen Komplex in einer zweiten Proteinfraction mit einem Molekulargewicht von etwa 160 000 vorkommen. Längere Verdauungszeiten führten zwar zum Abbau auch dieser Proteinfraction, er war jedoch begleitet von der Abnahme der enzymatischen Aktivitäten. Es lassen sich auf diesem Wege also nicht die enzymatisch aktiven Einzelenzyme aus dem Komplex abtrennen.

Durch die Möglichkeit der spezifischen Markierung von Kette A mit $1-^{14}\text{C}$ -Jodacetamid (10) war es aber möglich zu zeigen, daß durch Papain bevorzugt Kette A angegriffen wird, während B über längere Zeit intakt bleibt. Auch Schweizer fand, daß während der Enzymanreicherung A wahrscheinlich von endogenen Proteasen angegriffen wird, während B diesen gegenüber stabil zu sein scheint (16).

Das nach der partiellen Hydrolyse mit Papain isolierte Spaltstück sedimentiert in der analytischen Ultrazentrifuge mit $8,4 \pm 0,5$ S, das entspricht einem Molekulargewicht von etwa 160 000 bis 180 000 für ein globuläres Protein. Das Vorhandensein aller auf Kette B lokalisierten Teilaktivitäten sowie die Abwesenheit der auf A lokalisierten β -Ketoacylreduktase und der Bindungsstelle für Jodacetamid charakterisieren dieses als Untereinheit B der Fettsäuresynthetase. Die Acetyltransferase besitzt in der Untereinheit die doppelte spezifische Aktivität im Vergleich mit dem ungespaltenen Enzym und kann dadurch der Kette B zugeordnet werden.

Hagen (41), der Fettsäuresynthetase ebenfalls mit Papain behandelte, konnte zeigen, daß die Malonyltransferase noch zu 50 % aktiv ist, nachdem die Gesamtreaktion total geschädigt ist. Der Versuch, durch eine Rohrzuckerdichtegradienten-Zentrifugation enzymatisch aktive Spaltstücke nachzuweisen, scheiterte jedoch. Wahrscheinlich war die Trennstrecke in dem von ihm verwendeten Ausschwing-Rotor Modell SW 39 zu gering, um eine deutliche Auftrennung zwischen dem ungespaltenen Enzym und der Untereinheit zu erreichen.

V. Experimentelle Einzelheiten

1. Verwendete Geräte

Photometer Eppendorf mit Kompensationsschreiber GS11,
Netheler und Hinz, Hamburg
Spektralphotometer PM 6 und DMR 21, Zeiß, Oberkochen
Spektralphotometer Cary, Modell 14
Packard, Tri-Carb, Liquid Scintillation Spectrometer,
Modell 314
Searle, Nuclear Chicago Division, Mark II. Liquid Scintilla-
tion System
Automatic Superspeed Centrifuge, Servall RC-2 und RC-2B
Tischzentrifuge, Christ, Superspeed Junior 1
Tischzentrifuge, Hettich
Präparative Ultrazentrifuge, Beckmann-Spinco
Modell L 3-50, L 2-65 B, L 3-65 B
Analytische Ultrazentrifuge, Beckmann-Spinco, Modell E
Fraktionskollektoren und Schlauchpumpen der Firma LKB,
Bromma
pH-Meter E-500, Metrohm, Herisau
Schüttelwasserbad, Köttermann
Camag, Gleichspannungs-Speisegerät 1800 V
Shandon Universal -Elektrophorese-kammer U 77, Typ II mit
Zubehör für Immuno-Elektrophorese
Zellhomogenisator, Manton-Gaulin, Everett
Homogenisator, SG-Zauberstab
Isco-Modell UA-5, Absorbance Monitor mit Multiplexer-
Expander
Varian Aerograph 202 B gekoppelt mit Tri-Carb Combustion
Furnace Model 325 und Tri-Carb Liquid Scintillation
Spectrometer Model 2001 mit Anthracen-Durchflußzelle

2. Käufliche Chemikalien, Substrate und Enzyme

Enzyme und Coenzyme wurden, wenn nicht anders vermerkt, von der Firma C.F. Boehringer, Mannheim, bezogen.

Im folgenden nicht eigens aufgeführte Chemikalien stammten von der Firma E. Merck, Darmstadt, und besaßen die höchste erhältliche Reinheit.

Bäckerhefe von der Firma Hefe-Mayr, München

(Bast-Branntweinhefe)

Bierhefe von der Löwenbräu AG., München (Stamm S).

Sephadex G 25, Sepharose 6 B von Pharmacia, Uppsala.

Diäthylaminoäthyl-Cellulose DE 52 von Whatman, Maidstone

1-¹⁴C-Essigsäureanhydrid, 1-¹⁴C-Jodacetamid, Na₂-2-¹⁴C-Malonat und Na-¹⁴C-Hydrogencarbonat von Amersham-Buchler, Braunschweig

³H-Coenzym A von NEN, Dreieichenhain

Trypsin, Trypsininhibitor sowie die Chemikalien für die Polyacrylamid-Disk-Gelelektrophorese von der Firma Serva, Heidelberg

2-Mercapto-Äthanol von der Firma C. Roth, Karlsruhe

Serumalbumin vom Rind und Agarose von der Firma Behringwerke AG., Marburg

Unisolve I von der Firma Koch-Light, Colnbrook-Buchs

Komplettes Freund'sches Adjuvans, Difco Laboratories, Detroit
PPO und POPOP von Packard Instruments GmbH., Frankfurt (Main).

3. Synthese von Substraten

1-¹⁴C-Acetyl-CoA wurde nach (46) analog der Vorschrift für S-1-¹⁴C-Acetyl-N-Acetyl-cysteamin hergestellt.

2-¹⁴C-Malonyl-CoA nach (47) in der von Weithmann (43) angegebenen Modifizierung.

Acetyl-CoA nach (48)

Malonyl-CoA nach (47)

Palmityl-CoA nach (49) wurde von Herrn Engeser zur Verfügung gestellt.

S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamin nach (10).

Pantethein nach (43) durch Verseifen von S-Benzoylpantethein, welches nach (50) synthetisiert wurde.

S-Acetylpantethein analog der Vorschrift für Acetyl-CoA nach (48) wurde von Herrn Dr. Weithmann zur Verfügung gestellt.

Triacetsäurelaktone nach (51) wurde von Herrn Dr. Seyffert zur Verfügung gestellt.

4. Allgemeine analytische Methoden

a) Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wurde die Biuretmethode nach Beisenherz et al. (52) verwendet (Biuretfaktor 8,6 (10)). Für Routinebestimmungen wurde mit der Methode von Warburg und Christian (53) gearbeitet.

b) Radioaktivitätsbestimmungen

^{14}C - und ^3H -Bestimmungen wurden im Scintillationszähler durchgeführt.

Dioxan-Scintillationslösung:

1 l destilliertes Dioxan enthielt 100 g Naphthalin,
10 g PPO und 250 mg POPOP

Toluol-Scintillationslösung

1 l über basisches Aluminiumoxid filtriertes und
destilliertes Toluol enthielt 4 g PPO und
250 mg POPOP.

c) Gehaltsbestimmung von Thioestern

Acetyl-CoA wurde enzymatisch nach der Methode von Buckel und Eggerer (54) bestimmt, Malonyl-CoA mit dem optischen Test für Fettsäuresynthetase.

5. Isolierung und Aktivitätsbestimmung von Fettsäuresynthetase

Die Anreicherung von Fettsäuresynthetase erfolgte aus Bierhefe oder Bäckerhefe und folgte im wesentlichen der Vorschrift von Oesterhelt (10) mit den bei Schreckenbach (14) angegebenen Veränderungen. Zusätzlich wurde zum Aufschluß Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) bis zu einer Endkonzentration

von 1 g/l zugegeben, um Serinproteasen zu hemmen.

Fettsäuresynthetase wird durch PMSF nicht geschädigt, wie Weithmann (43) zeigen konnte.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im Standard-Enzymtest. Im Küvettenvolumen (1 ml) war enthalten: 100 μMol K-Phosphat pH 6.5, 10 μMol Cystein, 0.2 mg Serumalbumin, 0.07 μMol Acetyl-CoA, 0.2 μMol NADPH und 3-8 μg Enzym. Nach Verfolgen des Blindlaufs über 2-3 Min. wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.1 μMol Malonyl-CoA gestartet. Meßgröße war die Änderung der Extinktion bei 334 nm (25° C).

1 Einheit ist die Enzymmenge, die unter Testbedingungen 2 μMol NADPH pro Minute umsetzt (entsprechend 1 μMol Malonyl-CoA).

Ein immunologischer Vergleich von Fettsäuresynthetase aus Bäckerhefe und Bierhefe durch Doppeldiffusion nach Ouchterlony zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Enzympräparationen (s. Abb. 25).

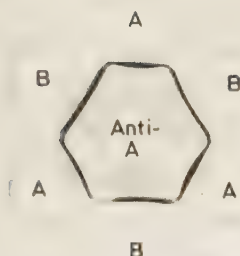


Abb. 25: Immunologischer Vergleich von Fettsäuresynthetase aus Bäcker- und Bierhefe

A: Fettsäuresynthetase aus Bäckerhefe

B: Fettsäuresynthetase aus Bierhefe

Anti A: Antiserum gegen Fettsäuresynthetase aus Bäckerhefe
(Nach Auswaschen von nicht präzipitiertem Protein wurde mit Amidoschwarzlösung angefärbt).

6. Zu Kapitel II

a) Gewinnung der Anti-Fettsäuresynthetase-Seren ^{*)}

Als Antigen wurde Fettsäuresynthetase aus Bäckerhefe verwendet, welche nach der oben beschriebenen Anreicherung zusätzlich über eine Rohrzuckerdichtegradientenzentrifugation gereinigt wurde. Die spezifischen Aktivitäten lagen zwischen 1700 und 2400 mE/mg.

*) Den Herren Dr. Timpl und Dr. Furtmeyer aus dem ehemaligen Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung bin ich für ihre Unterstützung bei der Bereitung der Antiseren sehr dankbar.

3 Kaninchen wurden parallel nach folgendem Immunisierungsschema behandelt:

1. Tag 5 mg FSS mit komplettem Freund'schen Ajuvans (KFA),
subcutan.
15. Tag 5 mg FSS, subcutan
27. Tag 1. Blutabnahme
29. Tag 5 mg FSS mit KFA, subcutan
43. Tag 5 mg FSS, subcutan
55. Tag 2. Blutabnahme
64. Tag 5 mg FSS mit KFA, subcutan
77. Tag 5 mg FSS, subcutan
89. Tag Herz-Katheter unter Narkose zur Abnahme des
gesamten Blutes.

b) Doppeldiffusion nach Ouchterlony

Im Wasserbad wurden 0.6 % Agarose in 0.1 M K-Phosphat pH 7.2 zur Lösung gebracht. Nach Zugabe von 0.02 % Natriumazid wird die noch heiße Lösung bis zu einer Höhe von 2 mm in eine Petrischale gegossen. Nach dem Erkalten wird mit einem Korkbohrer das Lochmuster gezeichnet und das Gel mit einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Pasteur-Pipette aus den Löchern gesaugt.

Diffusion in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur etwa 24 Stunden. Photographische Aufnahme unter indirekter Beleuchtung.

Teilweise wurde nicht präzipitiertes Protein durch ausführliches Waschen in 0.1 M K-Phosphat pH 6.5 entfernt. Nach An-

färben mit Amidoschwarzlösung wurde mit 7 % Essigsäure entfärbt.

c) Immuno-Elektrophorese (55)

Die Immuno-Elektrophorese wurde in einer Shandon-Universal-Elektrophoresekammer U 77 durchgeführt. Gelzusammensetzung: 1 % Agarose, 0.04 M K-Phosphat pH 7.5, 0.02 % Natriumazid. Elektrodenpuffer: 0.05 M K-Phosphat pH 7.5. Die Elektrophorese wurde mit 4 mA pro Objektträger über 1 1/2 Stunden durchgeführt. Nach Zugabe des Antiserums war die Präzipitationslinie nach 24 Stunden deutlich sichtbar. Nach Auswaschen nicht präzipitierten Proteins mit 0.1 M K-Phosphat pH 6.5 wurde anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen, das Gel getrocknet und mit Amidoschwarz-Lösung angefärbt, mit 7 %iger Essigsäure entfärbt.

d) Anreicherung der γ -Globuline (56)

Serum wurde mit 226 mg/ml Ammoniumsulfat (40 % der Sättigung) versetzt, zentrifugiert und mit 40 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung gewaschen. Nach der Aufnahme des Niederschlags in wenig 0.02 M K-Phosphat pH 7.5 wurde mehrere Stunden gegen diesen Puffer dialysiert und auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte DEAE-Cellulose-Säule aufgesetzt (10 x 2 cm). Die γ -Globuline werden mit dem Startpuffer eluiert. Verluste bei der Anreicherung - bezogen auf die Hemmwirkung - waren äußerst gering.

e) Gesamtaktivität der Fettsäuresynthetase in Gegenwart von Anti-FSS

Die Bestimmung der Gesamtaktivität erfolgte wie auf S. 49 beschrieben. Das Enzym wurde jedoch in der Küvette mit der entsprechenden Menge Anti-FSS- γ -G 5 Min. bei 25° C vorinkubiert. Anschließend erfolgte Substratzugabe und Start der Reaktion.

f) Kondensierende Teilaktivität in Gegenwart von Anti-FSS in Anlehnung an (1)

Der Inkubationsansatz enthielt im Volumen 0.3 ml: 0-80 μ g FSS, die mit der entsprechenden Menge Anti-FSS- γ -G 5 Min. bei 25° C vorinkubiert war, 50 μ Mol Tris pH 7.5, 2 μ Mol $\text{KH}^{14}\text{CO}_3$ (4×10^6 dpm), 5 μ Mol Cystein,, 5 μ Mol EDTA, 0.15 μ Mol CoA. Start mit 30 μ Mol S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamin. Stop nach 10 Min. mit 0.2 ml Eisessig. 0.3 ml wurden auf Whatman I Papier aufgetragen und die säurestabile Radioaktivität in 10 ml Toluol-Scintillationslösung ausgezählt.

Jeder Punkt der Kurve repräsentiert die durch eine Enzymabhängigkeit mit 10, 20, 40 und 80 μ g Fettsäuresynthetase bestimmte Aktivität in der Kondensation

g) β -Ketoacylreduktase in Gegenwart von Anti-FSS (1)

Die Küvette enthielt im Volumen 1 ml: 100 μ Mol K-Phosphat pH 6.5, 0.4 mg Serumalbumin, 0.2 μ Mol NADPH und etwa 5 μ g Fettsäuresynthetase, die mit der entsprechenden Menge Anti-FSS- γ -G 5 Min. bei 25° C vorinkubiert war. Nach Verfolgung des Blindlaufs über 2-3 Min. bei 334 nm wurde die Reaktion mit

5 μMol S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamin gestartet (25°C).

h) Enoylreduktase (Diaphorase-Aktivität) in Gegenwart von Anti-FSS (41,57)

Die Küvette enthielt im Volumen 1 ml: 100 μMol K-Phosphat pH 6.5, 40 nMol Dichlorphenolindophenol, etwa 1 μg Fettsäuresynthetase, die mit der entsprechenden Menge Anti-FSS- γ -G 5 Min. bei 25°C vorinkubiert war. Nach Verfolgung des Blindlaufs über 2-3 Min. bei 578 nm wurde mit 0.2 nMol NADH gestartet (25°C).

i) Triacetsäurelaktone (TAL)-Bildung in Gegenwart von Anti-FSS (25)

Der Inkubationsansatz enthielt im Volumen 0.5 ml: 10-40 μg Fettsäuresynthetase, die mit der entsprechenden Menge Anti-FSS- γ -G 5 Min. bei 25°C vorinkubiert war, 50 μMol K-Phosphat pH 7.5, 0.3 μMol 1- ^{14}C -Acetyl-CoA (4×10^5 dpm), 10 μMol Cystein. Start mit 0.6 μMol Malonyl-CoA; Stop nach 15 Min. mit 0.2 ml 10 %iger Perchlorsäure. Einmal mit 1 ml TAL-gesättigtem Äther, 5 mal mit je 1 ml Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet. Nach Verblasen des Äthers wurde der Rückstand in 0.1 ml Methanol aufgenommen und auf Kieselgel-Dünnschichtfolie aufgetragen. Laufmittel Chloroform:Essigsäure = 21 :4. Die TAL-Flecken wurden quantitativ abgeschabt und in 1 ml Methanol und 10 ml Dioxan-Scintillationsflüssigkeit ausgezählt.

Jeder Punkt der Kurve repräsentiert die durch eine Enzymabhängigkeit mit 10, 20 und 40 μg Fettsäuresynthetase bestimmte Aktivität in der TAL-Bildung.

j) Acetyl-Transferase in Gegenwart von Anti-FSS

Die Bestimmung folgt der Vorschrift von Weithmann (43). Der Inkubationsansatz enthielt im Volumen 1 ml: 200 μMol Tris/HCl pH 8.1, 10 μMol R,S-Malat, 3 μMol NAD^+ , 0.0625 μMol Acetylpanthetin, 11 E Malatdehydrogenase; nach Einstellung des Gleichgewichts der Hilfsreaktion (54) wurden 4.4 E Citratsynthase und 0.32 μMol Coenzym A zugegeben und mit 10 μg Fettsäuresynthetase, die mit der entsprechenden Menge Anti-FSS- γ -G vorinkubiert war (5 Min., 25°C) gestartet. Meßgröße ist die durch entstehendes NADH bewirkte Extinktionszunahme bei 334 nm.

k) Malonyl-Transferase in Gegenwart von Anti-FSS

Die Bestimmung erfolgte nach Weithmann (43). Ein gut verschließbares Zentrifugenglas enthielt im Volumen 0.75 ml: 50 μMol KPO_4 pH 6.5, 0.1 mg Serumalbumin, 0.06 μMol 2- ^{14}C -Malonyl-CoA (32 000 dpm) 0.6 μMol Pantethin. Der Start der Reaktion erfolgte durch 0.5–4 μg Fettsäuresynthetase, die mit der angegebenen Menge Anti-FSS- γ -G vorinkubiert war (5 Min. 25°C). Nach 5 Min. wurde mit 50 μl 3 N H_2SO_4 abgestoppt. Nachdem im Reaktionsansatz 450 mg Ammoniumsulfat gelöst worden waren, wurde das entstandene 2- ^{14}C -Malonylpantethin mit 5 ml wassergesättigtem Methyl-Äthyl-Keton extrahiert. 4.25 ml der Oberphase wurden mit 0.8 ml 1 % wässriger Kalium-

hydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt und diese mit dreimal 5 ml Scintillationslösung Unisolve I in ein Zählgläschen überführt und die Radioaktivität bestimmt.

1) Palmityl-Transferase in Gegenwart von Anti-FSS

Die Bestimmung erfolgte in Anlehnung an (58). Der Inkubationsansatz enthielt im Volumen 1 ml: 100 μ Mol K-Phosphat pH 6.5, 30 nMol ^3H -CoASH (76 320 dpm), 4 mg Glutathion, 20 nMol Palmityl-CoA, 0.75 mg Serumalbumin. Der Start der Reaktion erfolgte mit 1-8 μ g FSS, welche mit der angegebenen Menge Anti-FSS- γ -G vorinkubiert war (5 Min. 25° C). Nach 5 Min. bei Raumtemperatur wurde mit 50 μ l 3 M TCE abgestoppt und mit 20 nMol Palmityl-CoA als Träger abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde zweimal mit je 1 ml 0.3 M Trichlor-essigsäure gewaschen, anschließend in 0.5 ml 0.1 N NaOH gelöst und in ein Zählglaschen überführt, je einmal mit 0.5 ml und mit 0.2 ml 0.1 N NaOH nachgespült und mit 10 ml Unisolve die Radioaktivität gezählt.

m) Verteilung der Endprodukte nach Inkubation mit Anti-FSS

Die radiogaschromatographische Bestimmung folgte in allen Einzelheiten der von Sumper (31) angegebenen Vorschrift. Die Gesamtaktivität betrug nach Inkubation mit Anti-FSS- γ -G noch 25 % der Aktivität des unbehandelten Enzyms.

n) Zum Mechanismus der Hemmung durch Anti-FSS

Der Standardenzymtest enthielt 5 µg FSS, welche mit der angegebenen Menge Anti-FSS-γ-G vorinkubiert war (5 Min/25° C) und steigende Mengen Malonyl-CoA, wie in Abb. 15 angegeben.

o) Disk-Immunoelktrophorese (59)

Fettsäuresynthetase wurde nach (46) durch 3-maliges Einfrieren in 1 M Lithiumchlorid gespalten. Nach dem Abtrennen niedermolekularer Substanzen über Sephadex G 25 (0.1 M Tris/HCl pH 7.5) wurde ein Teil des Proteins der Disk-Elektrophorese (System Maurer 1) unterworfen.

Das Halbieren des Gels in der Längsachse erfolgte mit einer Rasierklinge, während das Gel durch zwei Plexiglasblöcke mit entsprechender Furche gehalten wurde.

Die eine Hälfte des Gels wurde 1 Std. in Coomassie-Färbelösung (59) angefärbt und anschließend in Entfärbelösung (70 ml Eisessig, 100 ml Methanol und 830 ml Wasser) entfärbt. Die andere Hälfte wurde zur Doppeldiffusion wie in der Legende von Abb. 16 beschrieben, in eine 60° C warme Agaroselösung eingebettet.

7. Zu Kapitel III

a) Kinetik der limitierten Hydrolyse mit Trypsin

Der Inkubationsansatz enthielt im Volumen 0.25 ml: 25 µMol Tris-HCl pH 7.5, 2.5 µMol CaCl₂, 4 mg FSS. Zum Zeitpunkt 0 wurde die Hydrolyse mit 0.1 mg Trypsin (3000 E/mg, Dimethyl-

casein als Substrat) bei 25° C gestartet. Zu den angegebenen Zeiten wurden jeweils 10 µl des Inkubationsansatzes entnommen, mit 30 µg Trypsininhibitor abgestoppt und mit eiskaltem Puffer auf 160 µl verdünnt. Aliquote dieser Verdünnung wurden sofort zur Bestimmung der verschiedenen Aktivitäten eingesetzt: Gesamtaktivität (s.S. 53), Acetyl- und Malonyltransferase optisch nach Weithmann (43), β -Ketoacylreduktase (1).

b) Kinetik der limitierten Hydrolyse mit Papain

Der Inkubationsansatz enthielt im Volumen 0.25 ml: 25 µMol K-Phosphat pH 6.5, 5.5 mg FSS. Zum Zeitpunkt 0 wurde die Hydrolyse mit 0.1 mg Papain (11 300 E/mg, Dimethylcasein als Substrat) bei 25° C gestartet.

Zu den angegebenen Zeiten wurden jeweils Aliquote des Inkubationsansatzes entnommen und 20-fach mit eiskaltem Puffer verdünnt. Teile dieser Verdünnung wurden sofort zur Bestimmung der verschiedenen Aktivitäten eingesetzt: Gesamtaktivität (s.S. 53), Acetyl- und Malonyltransferase optisch nach Weithmann (43), Kondensation (1), β -Ketoacylreduktase (1), Enoylreduktase (41,57).

c) Rohrzuckergradientenzentrifugation von ~~Papain~~-spaltener Fettsäuresynthetase

5 mg FSS, gelöst in 0.2 ml 0.1 M K-Phosphat pH 6.5, wurden bei 25° C mit 0.6 mg Papain inkubiert. Nach 15 Min. wurde durch Zugabe von Jodacetamid bis zu einer Endkonzentration von 10^{-2} M abgestoppt.

Folgender Rohrzuckergradient wurde gebildet: in ein 13 ml fassendes Cellulosenitrat Zentrifugenröhrchen wurden 1.5 ml 45 %ige (Gew/Vol) Rohrzuckerlösung in 0.1 M K-Phosphat pH 6.5 gegeben. Darüber wurde ein linearer Gradient von 8-25 % Rohrzucker (Gew./Vol) geschichtet.

Nach dem Überschichten mit der Inkubationslösung wurde 23 Std. bei 39 000 U/min und 4° C zentrifugiert. Die Becher wurden am Boden angestochen und Fraktionen von je 1 ml gesammelt. Die Proteinverteilung wurde durch Ausmessen der optischen Dichte bei 280 nm bestimmt.

Unbehandelte Fettsäuresynthetase und Aldolase dienten als interner und externer Standard.

d) Analytische Ultrazentrifugation *

Der Sedimentationslauf wurde mit 2° Aluminiumzellen bei 12 mm Schichtdicke ausgeführt. Rotor AN-D. Alle weiteren Daten sind der Legende von Abb. 21 zu entnehmen.

e) Beladung mit 1-¹⁴C-Jodacetamid

20 mg FSS gelöst in 0.5 ml 0.1 M K-Phosphat pH 6.5 wurden mit 500 nMol 1-¹⁴C-Jodacetamid (49 µCi/µMol) 2 Std. bei 0° C inkubiert. Anschließend wurde über Sephadex G 25 entsalzt und das beladene Enzym über Nacht bei 100 000 xg sedimentiert.

* Für die Durchführung der Zentrifugation bin ich Frau Döcker sehr verpflichtet.

f) Gel-Filtration von papaingespaltener Fettsäuresynthetase

Fettsäuresynthetase (15-20 mg/ml) wurde mit 2.5-3.5 Gew % Papain bei 25° C inkubiert. Nach 12 min wurde mit Jodacetamid bis zu einer Endkonzentration von 10^{-2} M abgestoppt und der Inkubationsansatz über eine Sepharose 6 B Säule (43 x 1.7 cm, äquiliбриert mit 0.1 M K-Phosphat pH 6.5) chromatographiert.

Eine Fraktion entspricht einem ml. Die einzelnen Teilreaktionen wurden, wie auf S. 53 beschrieben, bestimmt.

Die Radioaktivität wurde durch Auszählen von jeweils 0.2 ml des Eluats in 10 ml Unisolve bestimmt.

g) Anreicherung des Spaltstückes

20 mg FSS gelöst in 1 ml 0.1 M K-Phosphat pH 6.5 wurde 12 Min. bei 25° C mit 0.4 mg Papain inkubiert. Nach Abstoppen mit 10^{-2} M Jodacetamid wurde der Ansatz auf 20 ml mit 0.1 M K-Phosphat pH 6.5 verdünnt und 150 Min bei 255 000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde unter Rühren bis 40 % der Sättigung mit Ammoniumsulfat versetzt und 20 Min. bei 100000 xg zentrifugiert. Der Niederschlag wurde verworfen und der Überstand weiter bis 48 % der Sättigung mit Ammoniumsulfat versetzt und wieder 20 Min bei 100 000 xg zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in etwa 0.5 ml 0.1 M K-Phosphat pH 6.5 aufgenommen und gegen den gleichen Puffer dialysiert. Die Bestimmung der Teilaktivitäten erfolgte nach den Angaben auf S. 53.

In einigen Fällen wurde statt der Dialyse eine Chromatographie an Sepharose 6 B angeschlossen.

h) Polyacrylamidgelelektrophorese in Gegenwart von Natrium-Dodecylsulfat

Die Elektrophoresen wurden nach Weber und Osborn (60) in der von Schweizer (16) angegebenen Modifikation ausgeführt.

i) Gewinnung des Anti-Spaltstück-Serums

Als Antigen diente das nach Tab. 3, S.34 angereicherte Spaltstück.

1 Kaninchen wurde nach folgendem Immunisierungsschema behandelt:

- | | | |
|-----|-----|--|
| 1. | Tag | 4.4 mg Spaltstück mit komplettem Freund'schen Adjuvans (KFA), subcutan |
| 15. | Tag | 2 mg Spaltstück, subcutan |
| 29. | Tag | 2 mg Spaltstück mit KFA, subcutan |
| 42. | Tag | 1. Blutabnahme (4 ml aus der Ohrvene) |
| 43. | Tag | 2. Blutabnahme (80 ml aus der Ohrvene) |

5 ml Serum wurden bis 40 % d.S. mit Ammoniumsulfat gefällt, zentrifugiert, der Niederschlag einmal mit 40 %igem Ammoniumsulfat, 0.1 M Kaliumphosphat pH 6.5 gewaschen und anschließend in 1.7 ml 0.1 M Kaliumphosphat pH 6.5 aufgenommen.

j) Immunopräzipitation mit Anti-Spaltstück-Serum

Fettsäuresynthetase wurde, wie auf S.59 beschrieben, mit 1-¹⁴C-Jodacetamid beladen.

Ein Teil des beladenen Enzyms (b) wurde 1 Std. bei 0° C mit Desoxycholat behandelt:

1.6 mg Fettsäuresynthetase in 290 µl

0.1 M Tris/Acetat pH 8.5, zusätzlich

1.7 % Desoxycholat

Je 18 µl des Spaltansatzes (100 µg Protein) wurden in 300 µl 0.1 M K-Phosphat pH 6.5 mit steigenden Mengen Anti-Spaltstück-Serum 15 Min. bei 25° C inkubiert und je 50 µl zur Bestimmung der Acetyltransferase-Aktivität sowie der Radioaktivität eingesetzt. Darauf wurde 2 Min. bei 10.000 xg zentrifugiert und je 50 µl des Überstandes zur Bestimmung der Acetyltransferase-Aktivität sowie der Radioaktivität eingesetzt.

Der andere Teil (a) des beladenen Enzyms wurde ohne Behandlung mit Desoxycholat mit Anti-Spaltstück-Serum inkubiert.

Zusammenfassung

Zwei Untersuchungsmethoden zur Aufklärung der Struktur des Multienzymkomplexes Fettsäuresynthetase aus Hefe werden beschrieben.

1. Untersuchungen mit spezifischem Anti-Fettsäuresynthetase-Serum:

Kaninchen-Serum gegen Fettsäuresynthetase aus Hefe hemmt die Gesamtaktivität des Enzyms um 75 %. Von den untersuchten Teilaktivitäten werden nur die Malonyl- und Palmityltransferase geschädigt. Dieser Befund stützt die Vermutung, daß beide Teilreaktionen von ein und demselben Teilenzym katalysiert werden. Untersuchungen der Hemmkinetik zeigen, daß die Antikörper nicht unmittelbar gegen das aktive Zentrum der Malonyltransferase gerichtet sind. Eine Hohlraumstruktur des Multienzymkomplexes wird diskutiert.

2. Partielle Proteolyse des Multienzymkomplexes:

Nach kurzzeitiger Einwirkung von Papain auf Fettsäuresynthetase (Molekulargewicht 2.3 Millionen) wird ein Bruchstück mit einem Molekulargewicht von etwa 160000 freigesetzt, welches noch alle Teilaktivitäten der Kette B des Multienzymkomplexes besitzt. Die Anreicherung und Charakterisierung dieses Spaltstücks wird beschrieben. Die Abwesenheit aller auf Kette A lokalisierten Aktivitäten, sowie das Fehlen der auf A gelegenen Bindungsstelle für

Jodacetamid kennzeichnen das Spaltstück als Kette B des Multienzymkomplexes. Das Teilenzym Acetyltransferase wird der Kette B zugeordnet. Kleinere enzymatisch aktive Bruchstücke können nicht nachgewiesen werden. Eine Möglichkeit, die Kette A mit Hilfe von Antiserum gegen Kette B anzureichern, wird beschrieben.

Literaturverzeichnis

1. Lynen, F., Federation Proc. 20, 941 (1961)
2. Vagelos, P.R., Majerus, P.W., Alberts, A.V., Larrabee, A.R.,
and Ailhaud, G.P., Federation Proc. 25, 1485 (1966)
3. Brooks, J.L. and Stumpf, P.K., Biochim. Biophys. Acta 98
213 (1965)
4. Hsu, R.Y., Wasson, G. and Porter, J.W., J. Biol. Chem. 240.
3736 (1965)
5. Hsu, R.Y. and Yun, S.L., Biochemistry 9, 239 (1970)
6. Burton, D.N., Haavik, A.G., and Porter, J.W., Arch. Biochem.
Biophys. 126, 141 (1968)
7. Smith, S. and Abraham, S., J. Biol. Chem. 245, 3209 (1970)
8. Carey, E.M. and Dils, R., Biochim. Biophys. Acta 210,
371 (1970)
9. Lynen, F., Hopper-Kessel, I. und Eggerer, H., Biochem. Z.
340, 95 (1964)
10. Oesterhelt, D., Dissertation, Universität München (1967)
11. Schweizer, D., Piccinini, F., Duba, C., Günther, S., Ritter,
E. und Lynen, F., Eur. J. Biochem. 15, 483 (1970)
12. Ziegenhorn, J., Niedermeier, R. und Lynen, F., Hoppe
Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 137 (1970)
13. Ayling, J., Pirson, R., and Lynen, F., Biochemistry 11, 526
(1972)
14. Schreckenbach, T., Dissertation, Universität München (1975)
15. Sumper, M., Riepertinger, C. und Lynen, F., FEBS Letters 5,
45 (1969)
16. Schweizer, E., Kniep, B., Castorph, H. und Holzner, U.,
Eur. J. Biochem. 39, 353 (1973)

17. Crawford, I.P. and Yanofsky, C., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 44, 1161 (1958)
18. DeMoss, J.A., Biochem. Biophys. Res. Comm. 18, 850 (1965)
19. Guchhait, R.B., Polakis, S.E., Dimroth, P., Stoll, E., Moss, J. and Lane, M.D., J. Biol. Chem. 249, 6633 (1974)
20. Alberts, A.W. and Vagelos, P.R., in: The Enzymes, 3rd. ed., 6, 37 (P.D. Boyer, Ed.), Academic Press, New York, 1972
21. Spieß, J., Dissertation, München, 1976
22. Yourno, J., Kohno, T., and Roth, J.R., Nature 228, 820 (1970)
23. Hofschneider, P. and Hagen, A., Third European Regional Conf. Electr. Microscopy, Publ. House Czechos. Ac. Sci., Prague 1964, 69
24. Pilz, L, Herbst, M. und Kratky, O., Oesterheldt, D. und Lynen, F., Eur. J. Biochem. 13, 55 (1969)
25. Willecke, K., Dissertation, Universität München 1968
26. Brauster, M. and Cinader, B., J. Immunol. 87, 18 (1961)
27. Cinader, B., Ann. N.Y. Acad. Sci. 103, 495 (1963)
28. Yalpani, M., Willecke, K. und Lynen, F., Eur. J. Biochem. 8, 495 (1969)
29. Knobling, A., Schiffmann, D., Sickinger, H.-D. und Schweizer, E., Eur. J. Biochem. 56, 359 (1975)
30. Engeser, H., Hirsch, A. und Lynen, F., in Vorbereitung (1976)
31. Sumper, M. Oesterheldt, D., Riepertinger, C. und Lynen, F., Eur. J. Biochem. 10, 377 (1969)
32. Arnon, R., in: Acta endocrinologica, suppl. 194, Diszfalusy, E. (Hrsgb.), S. 133, Kopenhagen (1975)
33. Samuels, A., Ann. N.Y. Acad. Sci. 103, 858 (1963)
34. Fuller, T.C. and Marucci, A.A., J. Immunol. 106, 110 (1971)

35. Calvo, J.M. and Fink, G.R., Ann. Rev. Biochem. 40, 943 (1971)
36. Matchett, W.H. and de Moss, J.A., J. Biol. Chem. 250, 2941 (1975)
37. Bonner, D.M., deMoss, J.A. and Mills, S.E., in: Evolving Genes and Proteins. Bryson, V. and Vogel, H.J., eds. Academic Press, N.Y. 1965
38. Kohno, T. and Yourno, J., J. Biol. Chem. 246, 2203 (1971)
39. Grieshaber, M. and Bauerle, R., Nature New Biol. 236, 232 (1972)
40. Schechter, I. and Berger, A., Biochem. Biophys. Res. Comm. 32, 898 (1968)
41. Hagen, A., Dissertation, Universität München (1963)
42. Ziegenhorn, J., Dissertation, Universität München (1970)
43. Weithmann, K.U., Dissertation, Universität München (1974)
44. Oesterhelt, D., Bauer, H. and Lynen, F., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 63, 1377 (1969)
45. Winnewisser, W., persönliche Mitteilung
46. Sumper, M., Dissertation, Universität München (1970)
47. Eggerer, H. und Lynen, F., Biochem. Z. 335, 540 (1962)
48. Simon, E.J. and Shemin, D., J. Am. Chem. Soc. 75, 2520 (1953)
49. Seubert, W., Biochem. Prep. 7, 80 (1960)
50. Schwyzer, R., Helv. Chim. Acta 35, 1903 (1952)
51. Collie, N.J., J. Chem. Soc. 59, 609 (1891)
52. Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Czod, R., Barbade, K.H., Meyer-Ahrendt, E. und Pfeleiderer, G., Z. f. Naturf. 8b, 555 (1953)
53. Warburg, O. und Christian, W., Biochem. Z. 310, 384 (1942)
54. Buckel, W. und Eggerer, H., Biochem. Z. 343, 29 (1965)

55. Scheidegger, J.J., Int. Arch. Allergy 7, 103 (1955)
56. Williams, C.A. and Chase, M.W. (eds.) in: Methods in Immunology and Immunochemistry 1, 323. Acad. Press, New York and London (1967)
57. Seubert, W., in: Methoden der enzym. Analyse, H.U. Bergmeyer (Hrsgb.), S. 433, Verlag Chemie, Weinheim (1962)
58. Schweizer, E., Dissertation, Universität München (1963)
59. Maurer, H.R., Disk-Elektrophorese. Walter de Gruyter u.Co. Berlin (1968)
60. Weber, K. and Osborn, M., J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969)

Lebenslauf

geboren am	29. Dezember 1942 in Lübeck
Eltern	Hermann Hess, Industriekaufmann Gude Hess, geb. Gudehus
1949-1963	Volksschule und Oberschule in Lübeck
1963	Reifeprüfung
1963-1964	Kaufmännische Lehre in Baden-Baden
1964	Kaufmannsgehilfenprüfung
1964-1965	Kaufmännischer Angestellter in Hamburg
1965-1971	Studium der Chemie an der Universität München
1971	Diplom-Hauptprüfung
1971-1976	Diplom- und Doktorarbeit am Institut für Biochemie der Universität München und am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, unter Anleitung von Herrn Professor Dr. F. Lynen

